

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina y Cirugía

Departamento de Medicina



**El uso de marcadores de resistencia farmacológica y
marcadores poblacionales en malarias importadas como
herramienta para valorar la evolución de la estrategia del
tratamiento combinado con artemisininas en el continente
africano**

Aránzazu Amor Aramendía

Madrid, 2011

I. INTRODUCCIÓN	1
1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA MALARIA	1
1.1 El género <i>Plasmodium</i>	1
1.2 Ciclo biológico.....	1
1.3 Distribución endemidad e impacto de la malaria	3
1.4 Inmunidad de la malaria	6
2. TRATAMIENTO DE LA MALARIA	6
2.1 Estrategias de tratamiento.....	7
2.2 Resistencias a antimaláricos.....	7
A. Resistencia a cloroquina.....	8
B. Resistencia a amodiaquina.....	8
C. Resistencia a mefloquina.....	9
D. Resistencia a artemisininas.....	10
E. Resistencia a la combinación sulfadoxina/pirimetamina.....	10
F. Resistencia a la atovuona.....	11
2.3 Aparición y difusión de la resistencia a los antimaláricos	11
2.4 Estudio de la resistencia a los antimaláricos	13
A. Estudios <i>in vivo</i>	13
B. Estudios <i>in vitro</i>	13
C. Estudios de farmacocinética y farmacodinámica	13
D. Técnicas moleculares	13
2.5 Perspectiva del tratamiento	14
3. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA MALARIA	15
3.1 Variabilidad genética y multiplicidad de la infección	15
A. Diversidad y transmisión.....	16
B. Diversidad edad e inmunidad	16
C. Diversidad y morbilidad.....	16
3.1.1 Marcadores moleculares para el estudio de la diversidad de poblaciones de <i>Plasmodium falciparum</i>	17
A. Proteína de superficie del merozoíto1 (MSP-1)	17
B. Proteína de superficie del merozoíto2 (MSP-2).....	18
3.2 Marcadores moleculares de resistencia a antipalúdicos.....	19
A. Mutaciones en los genes <i>pfdrfr</i> y <i>pfdrps</i>	19
B. Mutaciones en los genes <i>pfcr</i> y <i>pfmdr1</i>	20
C. Mutaciones en el gen <i>pfcyt1</i>	20
D. Aumento del número de copias génicas	21
4. GUINEA ECUATORIAL	21
II. OBJETIVOS	24
1. OBJETIVO GENERAL	24
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24

III. MATERIALES Y MÉTODOS	25
1. MUESTRA BIOLÓGICA	25
2. DATOS	26
3. ANÁLISIS MOLECULAR	26
3.1 Extracción de ADN.....	26
3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de malaria	26
3.3 PCR-RFLP para la detección de mutaciones puntuales en genes de <i>P. falciparum</i> relacionados con resistencia a antimaláricos	27
a. gen del enzima Dihidrofolato Reductasa (<i>pfldhfr</i>).....	27
b. gen del enzima Dihidropteroato Sintetasa (<i>pfldhps</i>).....	29
c. gen del transpotador de cloroquina asociado a resistencia (<i>pfert</i>).....	31
d. gen de la proteína relacionada con multirresistencia (<i>pfmdr1</i>).....	32
3.4 PCR anidada para la caracterización genética de poblaciones de <i>P. falciparum</i> y estudio de multiplicidad de la infección	34
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
IV. CAPÍTULO I	36
EVOLUCIÓN DE MARCADORES MOLECULARES DE RESISTENCIA A ANTIMALÁRICOS EN AISLADOS AFRICANOS DE <i>Plasmodium falciparum</i> DURANTE 8 AÑOS: IMPACTO DE LA INTRODUCCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS COMBINADOS CON ARTEMISININAS (ACTs).	
1. Introducción	36
2. Materiales y Métodos	38
3. Resultados	39
4. Discusión.....	44
5. Conclusiones	47
V. CAPÍTULO II	48
RELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS Y ANALÍTICOS DE LA INFECCIÓN POR <i>Plasmodium falciparum</i> Y MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A RESISTENCIA EN PACIENTES PROCEDENTES DE ÁFRICA.	
1. Introducción	48
2. Materiales y Métodos	49
3. Resultados	52
4. Discusión.....	59
5. Conclusiones	63

VI. CAPÍTULO III **64****VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Plasmodium falciparum* EN GUINEA ECUATORIAL Y SU RELACIÓN CON MUTACIONES ASOCIADAS A RESISTENCIA A ANTIMALÁRICOS.**

1. Introducción	64
2. Materiales y Métodos	65
3. Resultados	67
4. Discusión.....	71
5. Conclusiones	73

VII. DISCUSIÓN GENERAL **74****VIII. CONCLUSIONES GENERALES** **83****IX. BIBLIOGRAFÍA** **85**

Índice de Tablas y Figuras

Tablas

Tabla 1: Mutaciones en los genes <i>pfdhps</i> y <i>pfdhfr</i> .	20
Tabla 2: Mutaciones en los genes <i>pfcr1</i> y <i>pfmdr1</i> .	20
Tabla 3: PCR múltiple para la detección de <i>Plasmodium spp.</i>	26
Tabla 4: PCR anidada para la detección de mutaciones en los codones 51, 59, 108 y 164 del gen <i>pfdhfr</i> .	28
Tabla 5: Digestión enzimática del gen <i>pfdhfr</i> .	28
Tabla 6: PCR anidada para la detección de mutaciones en los codones 436, 437, 540, 581 del gen <i>pfdhps</i> .	30
Tabla 7: Digestión enzimática del gen <i>pfdhps</i> .	30
Tabla 8: PCR anidada para la detección de mutaciones en el codón 76 del gen <i>pfcr1</i> .	31
Tabla 9: Digestión enzimática del gen <i>pfcr1</i> .	32
Tabla 10: PCR anidada para la detección de mutaciones en los codones 86 y 1246 gen <i>pfmdr1</i> .	32
Tabla11: Digestión enzimática del gen <i>pfmdr1</i> .	33
Tabla12: PCR anidada para la determinación de familias alélicas del gen <i>pfmsp1</i> .	34
Tabla 1.1: Prevalencia de alelos salvajes y mutados en la muestra.	40
Tabla 1.2: Distribución de los genotipos <i>pfdhfr</i> en la muestra.	41
Tabla 1.3: Distribución de los genotipos <i>pfdhps</i> en la muestra.	42
Tabla 2.1: Características epidemiológicas de los pacientes.	52
Tabla 2.2: Características en relación con el índice de inmunidad.	
Tabla 2.3: Perfiles clínico, analítico y de la infección de los pacientes.	
Tabla 2.4: Alelos salvajes y mutados en la muestra.	

Tabla 2.5: Relación entre los perfiles clínico, analítico y de la infección y la presencia de alelos salvajes y mutados.	
Tabla 2.6: Frecuencia de alelos salvajes y mutados en pacientes no inmunes frente a semiinmunes, pacientes no inmunes frente a inmunes y pacientes semiinmunes frente a inmunes.	
Tabla 2.7: Malaria no complicada vs malaria complicada.	
Tabla 2.8: Presencia de síntomas neurológicos vs ausencia de síntomas neurológicos.	
Tabla 2.9: Presencia de anemia vs ausencia de anemia.	
Tabla 3.1: Distribución de los alelos <i>pfmsp1</i> -K1 en los periodos 2002-2006/2008-2010.	65
Tabla 3.2: Distribución de los alelos <i>pfmsp1</i> -Mad20 en los periodos 2002-2006/2008-2010.	66
Tabla 3.3: Distribución de los alelos <i>pfmsp1</i> -RO33 en los periodos 2002-2005/2008-2010.	66
Tabla 3.4: Alelos salvajes (W) y mutados (M) (%) en Guinea Ecuatorial en los periodos 2002-2006/2008-2010.	67
Tabla 3.5: Relación entre MOI y alelos de resistencia en Guinea Ecuatorial (2002-2010).	68
Tabla 3.6: Relación entre MOI y alelos de resistencia en Guinea Ecuatorial (2002-2006).	68
Tabla 3.7: Relación entre MOI y alelos de resistencia en Guinea Ecuatorial (2008-2010).	68

Figuras

Figura 1: Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> spp.	3
Figura 2: Zonas de transmisión de malaria.	4
Figura 3: Distribución de especies de malaria.	5
Figura 4: Mecanismo de acción de la cloroquina y amodiaquina.	9
Figura 5: Mecanismo de acción de la mefloquina.	9
Figura 6: Estructura del PfATP6. Mecanismo de acción de artemisininas.	10
Figura 7: Puntos de mutación en las proteínas PfDHFR Y PfDHPS.	10

Figura 8: Estructura tridimensional del citocromo bc1.	11
Figura 9: Mapa de emergencia de multi-resistencia en 2001.	12
Figura 10: Resistencia a artemisininas en el sudeste asiático.	12
Figura 11: Esquema del gen <i>pfmsp1</i> .	17
Figura 12: Esquema del gen <i>pfmsp2</i> .	18
Figura 13: Situación y división territorial de Guinea Ecuatorial.	21
Figura 14: Distribución de pacientes por regiones africanas de procedencia.	25
Figura 15: PCR-RFLP para el estudio del gen <i>pfdhfr</i> .	29
Figura 16: PCR-RFLP para el estudio del gen <i>pfdhps</i> .	31
Figura 17: PCR-RFLP para el estudio del gen <i>pfmdr1</i> .	33
Figura 18: Amplificaciones de las tres familias del gen <i>msh1</i> .	35
Figura 1.1: Distribución de los pacientes por regiones africanas de procedencia.	38
Figura 1.2: Distribución de los haplotipos <i>dhfr-dhps</i> 2002-2010.	43
Figura 1.3: Distribución de haplotipos <i>pfdhfr-pfdhps</i> por regiones y periodos de estudio.	44
Figura 2.1: Países africanos de origen de los pacientes de la muestra.	50

ABREVIATURAS EN ESPAÑOL

A/G: Alanina/Glicina

A/V: Alanina/Valina

A/S/T: Alanina/Serina/Treonina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AL: Artesunato-Lumefantrina

Ala: Alanina

AQ: Artesunato.Amodiaquina

AS: Artesunato

AS+AQ: Artesunato-Amodiaquina (AS+AQ)

AS+MQ: Artesunato-Mefloquina

AS+SP: Artesunato-Sulfadoxina-Pirimetamina

Asn: Asparagina

Asp: Ácido aspártico

Arg: Arginina

C/R: Cisteína/Arginina

Cis: Cisteína

CQ: Cloroquina

CSP: Proteína del Circunsporozoíto

DHA+PPQ: Dihidroartemisinina–Piperaquina

DHFR: Dihidrofolato Reductasa

DHPS: Dihidropteroato Sintetasa

D/Y: Ácido aspártico/Tirosina

EDTA: Ácido Etilendiaminotetracetato Sódico

Gli: Glicina

Glu: Ácido glutámico

GLURP: Proteína Rica en Glutamina

I/L: Isoleucina/Leucina

Ile: Isoleucina

K/E: Lisina/Ácido glutámico

K/T: Lisina/Treonina

Kb: Kilobase

KDa: KiloDalton

Leu: Leucina

Lis: Lisina

M: alelo mutado

Mb: Megabase

MSP-1: Proteína de Superficie del Merozoíto 1

MSP-2: Proteína de Superficie del Merozoíto 2

N/I: Asparagina/Isoleucina

N/Y: Asparagina/Tirosina

S: alelo salvaje

S/F: Serina/Fenilalanina

S/N: Serina/Asparagina

Ser: Serina

SP: Sulfadoxina-Pirimetamina

Tir: Tirosina

TPI: Terapia Preventiva Intermitente

TPIe: Tratamiento Preventivo Intermitente en embarazadas.

Tre: Treonina

µl: microlitros

OMS: Organización Mundial de la Salud

P.falciparum: *Plasmodium falciparum*

P. vivax: *Plasmodium vivax*

P. ovale: *Plasmodium ovale*

P. malariae: *Plasmodium malariae*

P. knowlesi: *Plasmodium knowlesi*

pb: pares de bases

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

ABREVIATURAS EN INGLÉS

ACT: Artemisinin-Based Combination Therapy

DNA: Deoxyribonucleic Acid

GMEP: Global Malaria Eradication Program

GLURP: Glutamine-Rich Protein

IPTc: Intermittent Preventive Therapy in children

IPTi: Intermittent Preventive Therapy in infants

IPTp: Intermittent Preventive Therapy in pregnant woman

LLIN: Long-Lasting Insecticide Treated Net

MSP1: Merozoite Surface Protein-1

MSP2: Merozoite Surface Protein -2

MDA: Mass Drug Administration

MOI: Multiplicity Of Infection

PCR: Polymerase Chain Reaction. Reacción en cadena de la polimerasa

RFLP: Restriction Fragments Length Polymorphism .Restricción de fragmentos de longitud polimórfica

PCR-RFLPs: Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragments Length Polymorphism.

PfATP6: *P. falciparum* sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase 6

PfMDR1: *Plasmodium falciparum* Multidrug Resistance Transporter.

PfCRT: *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter.

Pfcytb1: gene encoding the *P. falciparum* cytochrome b1 system.

pfcr: gene encoding the *P. falciparum* chloroquine resistance transporter.

pfdhfr: gene encoding the *P. falciparum* dihydrofolate reductase.

pfdhps: gene encoding the *P. falciparum* dihydropteroate synthase.

Pfglurp: gene encoding the glutamine-rich protein.

pfmdr1: gene encoding the *P. falciparum* multidrug resistance 1 protein.

pfmsp1: gene encoding the merozoite surface protein1.

pfmsp1-K1: gene encoding the merozoite surface protein1, K1 family

pfmsp1-MAD20: gene encoding the merozoite surface protein1, MAD20 family.

pfmsp1-RO33: gene encoding the merozoite surface protein1. RO33 family.

pfmsp1-MR: gene encoding the merozoite surface protein1, MR family.

pfmsp2: gene encoding the merozoite surface protein-2.

pfmsp2-FC27: gene encoding the merozoite surface protein2, FC27 family.

pfmsp2-3D7: gene encoding the merozoite surface protein2, 3D7 family.

pftrap: gene encoding the thrombospondin-related adhesive protein.

SNP: Single Nucleotide Polymorphism.

SPSS: Statistical Software Package.

TRAP: Thrombospondin-Related Adhesive Protein. Proteína de adhesión a la Trombospondina

WHO World Health Organization

Introducción

1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA MALARIA

1.1 El Género *Plasmodium*

La malaria es una enfermedad causada por protozoos parásitos del género *Plasmodium* (Marchiafava y Celli, 1885). El género *Plasmodium* incluye al menos 172 especies de parásitos intraeritrocitarios, que infectan a un amplio rango de hospedadores vertebrados, como primates, roedores, pájaros y reptiles. En la actualidad se conocen cinco especies que afectan al hombre: *Plasmodium* (*L.*) *falciparum* (Welch, 1897), *Plasmodium* (*P.*) *vivax* (Grassi y Feletti, 1890), *Plasmodium* (*P.*) *ovale* (Stephens, 1922), *Plasmodium* (*P.*) *malariae* (Laveran, 1881) y *Plasmodium* (*P.*) *knowlesi*. (Knowles, 1932). Ésta última, que habitualmente infecta a macacos, es considerada como la quinta especie desde los casos detectados en Malasia a partir del año 1999 (Singh y col., 2004; White, 2008).

Existen diferencias especie-específicas en cuanto a la distribución geográfica, la transmisión y especies de mosquitos implicadas en ella, el ciclo biológico, el período de incubación de la enfermedad, la existencia de formas latentes o hipnozoítos, la edad de los glóbulos rojos parasitados y la duración de la esquizogonia eritrocítica. Todas estas diferencias tienen implicaciones tanto en el diagnóstico, como en las manifestaciones clínicas y el tratamiento. *P. falciparum* es un protozoo con un genoma haploide, aproximadamente de 3×10^7 pares de bases (pb), distribuido en tres localizaciones diferentes: en el núcleo donde se agrupa en 14 cromosomas (23Mb), en el apicoplasto (35Kb) y una pequeña parte (6Kb) en la mitocondria.

Las especies más prevalentes a nivel mundial son *P. vivax* y *P. falciparum*. Estimaciones recientes apuntan a un aumento de la incidencia de infecciones por *P. falciparum* respecto a *P. vivax* (Snow y col., 2005; Dash y col., 2008), aumento relacionado con la resistencia a antimaláricos de *P. falciparum*, especie que produce la forma más grave de la enfermedad, con un alto índice de mortalidad. Hay que destacar no obstante que cada vez existen más datos que alertan de la alta capacidad de *P. vivax* para producir malaria grave (Price y col. 2009; Bassat y col. 2011).

1.2 Ciclo Biológico

En el ciclo biológico están involucrados dos hospedadores, el hombre u hospedador intermediario, donde se produce la fase asexual del parásito, o esquizogonia, y la hembra de mosquitos del género *Anopheles*, que actúa como hospedador definitivo, donde se produce la fase sexual del parásito, o esporogonia. Los distintos estadios del parásito presentan una amplia variabilidad genética y antigénica (Carlton y col., 2008).

Cuando una hembra de mosquito *Anopheles* infectada pica al hombre, inocula los esporozoítos, que son la forma infectiva del parásito para el hombre. Una vez alcanzado el torrente circulatorio, los esporozoítos llegan en poco tiempo al hígado, donde invaden los hepatocitos. En ellos se multiplican durante un periodo de 7 a 10 días (multiplicación exoeritrocítica o esquizogonia hepática), que termina con la formación de esquizontes hepáticos. La rotura de cada uno de los esquizontes hepáticos produce la liberación de cientos de merozoítos a la circulación general. Solamente en dos especies, *P. ovale* y *P. vivax*, quedan formas latentes o hipnozoítos en el hígado, que pueden producir recidivas semanas o años después.

En la sangre los merozoítos invaden los eritrocitos, donde se desarrolla un nuevo estadio del parásito, el trofozoíto. Este trofozoíto va madurando en el interior del glóbulo rojo y comienza a dividirse, en un proceso denominado esquizogonia hemática, hasta formar un esquizonte constituido por un número de merozoítos distinto para cada especie. El esquizonte maduro se rompe liberando merozoítos que invaden nuevos eritrocitos. Durante esta fase se produce la clínica en el paciente. Algunos merozoítos están determinados genéticamente para desarrollarse como gametocitos y originan macrogametocitos o gametocitos femeninos y microgametocitos o gametocitos masculinos.

Cuando el hombre infectado es picado por una nueva hembra del mosquito, la sangre parasitada con los gametocitos es ingurgitada. Los gametocitos pasan al estómago del mosquito junto al resto de formas parasitarias que hubiera en ese momento en el hospedador intermediario. Allí los macrogametocitos se transforman en macrogametos (gametos femeninos) y los microgametocitos sufren un proceso denominado exflagelación, que da lugar a la producción de los gametos masculinos. La fecundación del macrogameto por el microgameto da lugar al cigoto, única fase diploide del parásito. Este cigoto se transforma en un oocineto, móvil, que penetra en el epitelio columnar que reviste el estómago del mosquito y queda en el tejido conectivo donde madura a ooquiste. En éste se produce la reducción meiótica y la división nuclear y citoplasmática, formándose esporozoítos haploides. Estos esporozoítos salen al hemocele y se distribuyen por todo el mosquito aunque tienen un especial tropismo por las glándulas salivales. Al llegar a la pared externa de las glándulas penetran en ellas y quedan localizados en su interior, desde donde serán inoculados con una nueva picadura a otro hospedador humano, perpetuando así el ciclo de la malaria (figura 1).

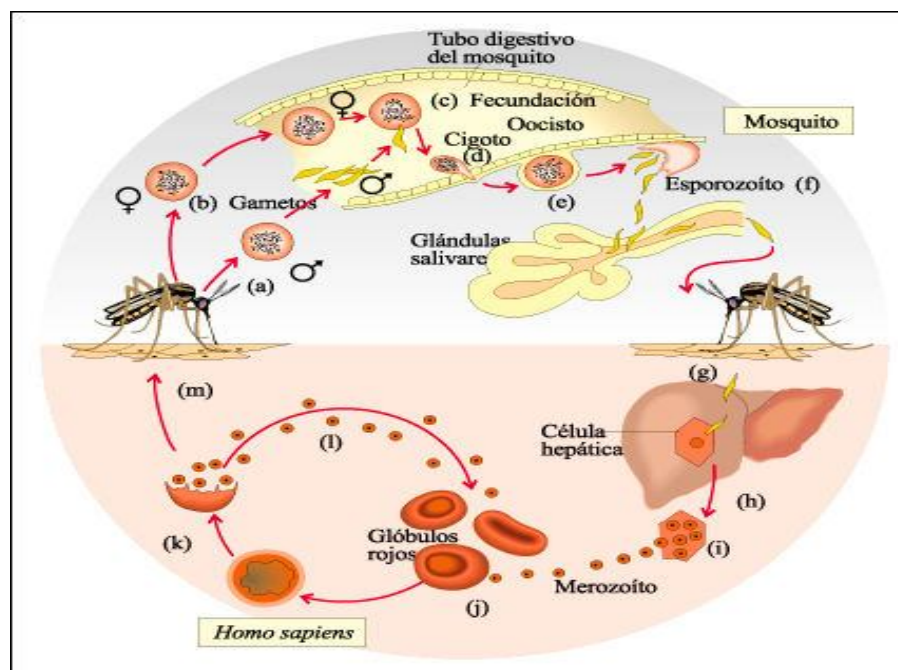


Figura 1.- Ciclo biológico de *Plasmodium* spp. (g) Con la picadura los esporozoítos son inoculados al hombre. (h) Esquizogonia hepática. (i) Liberación de merozoítos que pasan a la circulación general. (j) Esquizogonia hemática. (k) Invasión de nuevos eritrocitos y transformación de algunos merozoítos en los gametocitos. (m) Entrada de parásitos en el mosquito con la picadura. (a, b) Formación de los gametos. (c) Formación del cigoto. (d) El oocineto móvil penetra en la pared del estómago del mosquito. (e) Formación del ooquiste. (f) Formación de los esporozoítos y migración a glándulas salivales.

1.3.- Distribución, endemidad e impacto de la malaria

La malaria aparece en áreas tropicales y subtropicales del mundo. La transmisión de la infección depende de la presencia de mosquitos del género *Anopheles* que actúen como vectores y del hombre como reservorio. El mosquito se desarrolla en un rango de temperatura entre 16 y 33° C, por debajo de los 2.000 metros de altitud, y en ambientes de alta humedad. La intensidad de la transmisión depende del nivel de precipitaciones, que determina la densidad anofelina, y del comportamiento del vector (Carter y col., 2002; Lee y col., 2009).

El nivel de endemidad de la malaria se puede establecer en base a tres índices:

- La tasa esplénica, que representa el porcentaje de niños entre 2 y 9 años de edad con esplenomegalia palpable.
- La tasa parasitaria o porcentaje de población con parásitos en sangre.
- La tasa de inoculación entomológica, que se define como el número de picaduras infectivas que sufre una persona por unidad de tiempo.

Éste último es el índice más usado por su mayor exactitud; en función del número de picaduras /año que sufre una persona de un área se establecen 4 categorías de endemidad en zonas de transmisión de malaria:

- Zona hipoendémica: 1 picadura/año
- Zona mesoendémica: entre 1 y 10 picaduras/año.
- Zona hiperendémica: entre 11 y 100 picaduras/año.
- Zona holoendémica: más de 100 picaduras/año.

Existen además zonas de riesgo de transmisión de malaria en forma de epidemias, relacionadas con conflictos bélicos, catástrofes ambientales y humanitarias, deforestación y urbanización. (Bayoh y col., 2011).

En la actualidad la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce 106 países, distribuidos en 4 regiones, África, Pacífico, América y Oriente Medio, afectados por la malaria (figura 2).

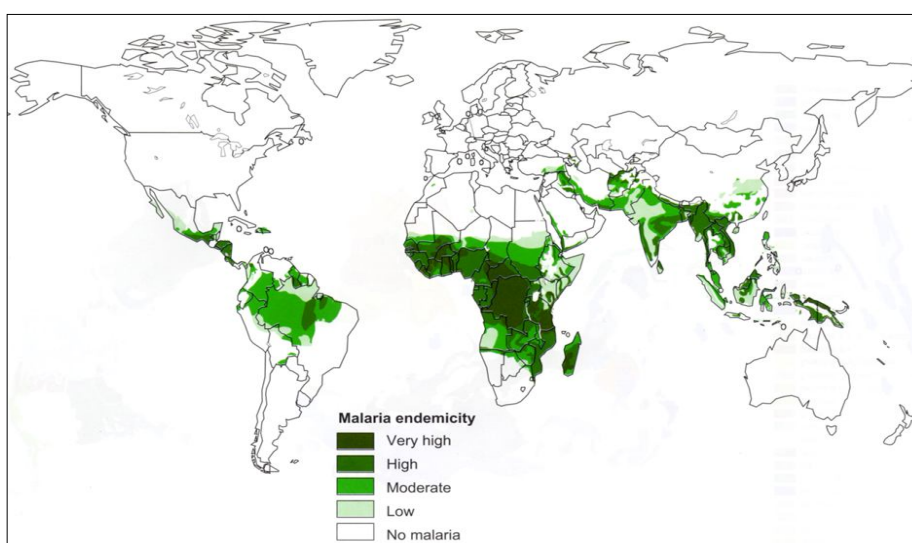


Figura 2.- Zonas de transmisión de malaria.

El informe emitido por la OMS en enero de 2010, refiere que 3,28 billones de personas viven en áreas con riesgo de transmisión de malaria y aproximadamente 1,2 billones de personas (la mitad de la población mundial) viven en áreas de alto riesgo de transmisión de malaria. En 2009 se produjeron alrededor de 225 millones de casos clínicos de malaria y 781.000 de muertes relacionadas con esta infección (WHO 2010). A pesar de su magnitud, (más de 2.100 muertes al día por malaria), estas cifras reflejan un descenso importante en la prevalencia e incidencia de malaria con respecto a años anteriores. Los factores que han favorecido este descenso han sido:

- El aumento de los recursos financieros invertidos en las políticas de control de la malaria.
- El éxito de las campañas para promover el uso de mosquiteras impregnadas con insecticidas de larga duración (“Long Lasting Insecticide Treated Nets”, LLINs).
- El uso cada vez más frecuente de los tests de diagnóstico rápido.
- Las terapias basadas en tratamientos combinados con artemisinina (“Artemisinin-based Combination Therapies”, ACTs).

Más del 90% de las muertes causadas por malaria se producen en África subsahariana (Miller y col., 2002). Las mujeres embarazadas y los niños menores de 5 años, son los grupos en los que existe mayor riesgo de infección, complicaciones y muerte. También son especialmente vulnerables los pacientes VIH positivos (Davenport y col., 2010; Muema y col., 2011).

Las especies que afectan al hombre tienen distinta distribución geográfica (figura 3):

- *P. falciparum* se halla en todas las áreas tropicales y subtropicales donde existe transmisión de malaria. Predomina en África, donde produce el 80-90% de los casos de malaria. Es la especie causante del 40-50% de los casos del oeste del Pacífico y sureste asiático y del 4-30% en el sur de Asia, América.
- *P. vivax* se localiza en América central y del sur centro, donde produce el 70-90% de los casos; sureste Asiático y Oeste del Pacífico, donde produce el 50-60% de los casos. En África se encuentra principalmente en la costa este, pero en la actualidad ya se han descrito casos en la costa oeste (Mendes y col. 2011).
- *P. ovale* se encuentra habitualmente en África, especialmente África subsahariana. Es muy poco frecuente fuera de este continente, pero actualmente hay casos que hacen que haya sido calificada como una especie emergente en el sureste Asiático (Wickremasinghe y col., 2008).
- *P. malariae* se encuentra en todas las áreas donde existe transmisión de malaria, pero con una incidencia muy baja (2-3% de los casos en África).
- *P. knowlesi* se localiza en el sureste asiático, en Tailandia, Vietnam, Myanmar, Filipinas y, especialmente, en Malasia.

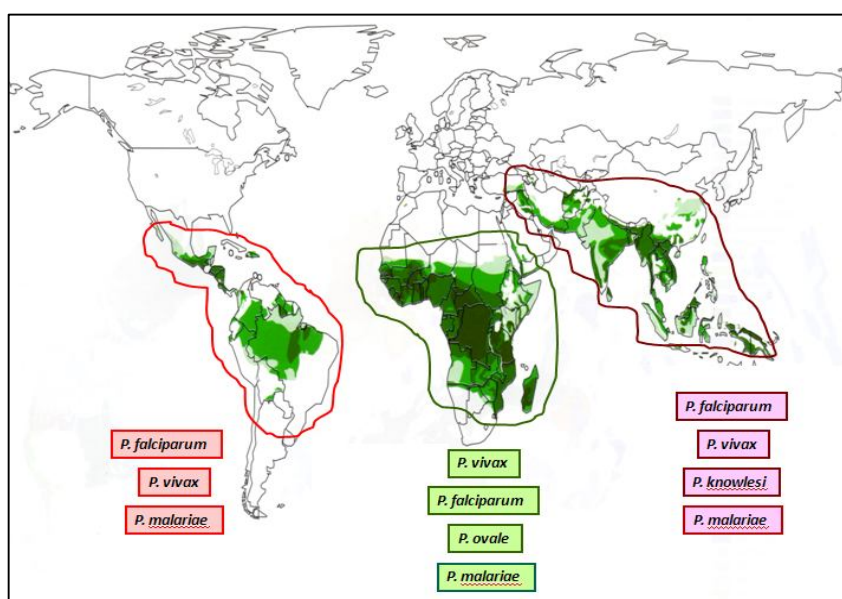


Figura 3.- Distribución de especies de malaria.

1.4.- Inmunidad de la malaria

En áreas holoendémicas de malaria, las personas expuestas de forma permanente y prolongada a la infección desarrollan cierta inmunidad adquirida, por lo que raramente desarrollan enfermedad clínica, a pesar de sufrir infecciones por malaria. En el hombre se han definido distintos tipos de inmunidad adquirida o adaptativa contra la malaria:

- Inmunidad “anti enfermedad”: confiere protección contra la enfermedad clínica.; afecta a la morbilidad asociada a una densidad parasitaria alta.
- Inmunidad “anti parásito”: confiere protección frente a altas densidades parasitarias.
- Premunición: proporciona protección frente a nuevas infecciones, manteniendo parasitemias bajas y generalmente asintomáticas. En este caso, la protección es definida como la evidencia objetiva de bajo riesgo de enfermedad clínica, indicada por ausencia de fiebre (temperatura axilar inferior a 37,5°C) con parasitemia pero en bajas densidades.

En estas zonas, las infecciones en adultos son habitualmente asintomáticas y con parasitemias bajas, sin embargo en niños menores de 5 años la morbilidad y mortalidad producida por *P. falciparum* es alta debido a que no han desarrollado aun una inmunidad protectora (Doolan y col., 2009).

La semiinmunidad que protege al individuo en la edad adulta, se adquiere a lo largo del tiempo y tras sucesivas infecciones. Pero esta inmunidad protectora, se pierde cuando los adultos abandonan la zona endémica, o cuando la endemidad en una zona disminuye por el efecto de intervenciones para controlar la malaria (Ghani y col., 2009). En mujeres embarazadas, especialmente en las primíparas, la inmunidad frente a la malaria está comprometida (Rogerson y col., 2007).

En áreas de menor endemidad, especialmente si la transmisión es estacional o inestable, el desarrollo de inmunidad clínica es menos eficaz y la malaria sintomática y grave ocurre a cualquier edad (Doolan y col., 2009).

2. TRATAMIENTO DE LA MALARIA

El empleo de antipalúdicos se regulariza a nivel internacional desde 1955, con el uso de cloroquina (CQ) como tratamiento de la malaria, recomendado por la OMS y aceptado por los Planes Nacionales de cada país como tratamiento de la infección. Desde estos años hasta la actualidad se han utilizado numerosos fármacos antimaláricos tanto en monoterapia como en distintas combinaciones.

2.1 Estrategias de tratamiento

En el contexto de las campañas de erradicación de la malaria realizadas en el pasado, se utilizaron antimaláricos tanto para el tratamiento de la enfermedad como para el tratamiento del reservorio (personas asintomáticas portadoras de gametocitos), con los programas de administración en masa (Mass Drug Administration, MDA).

En la actualidad, con el fin de evitar complicaciones graves de la enfermedad y reducir la transmisión, los antimaláricos se utilizan para el tratamiento de la malaria clínica (Nájera y col., 2011), abandonando el tratamiento de posibles reservorios. Además el diagnóstico de confirmación es recomendable siempre antes del inicio del tratamiento

Según las últimas recomendaciones de la OMS las estrategias de tratamiento deben basarse en monitorizaciones de la eficacia terapéutica de los tratamientos. El fármaco o la combinación usados deben tener una eficacia superior al 90%.

Durante la pasada década los países donde la malaria es endémica han adoptado políticas de tratamiento basadas en el uso de artemisininas, fármacos potentes y rápidos, con otros de vida media larga. Son las llamadas terapias basadas en combinaciones con artemisininas (“Artemisinin-based Combinations Therapies”, ACTs) (WHO 2010).

Son cinco las combinaciones con derivados de artemisininas utilizadas como primera línea de tratamiento en países endémicos desde la pasada década y hasta hoy:

- Arremeter-Lumefantrina (AL)
- Artesunato-Amodiaquina (AS+AQ)
- Artesunato-Mefloquina (AS+MQ)
- Artesunato-Sulfadoxina-Pirimetamina (AS+SP)
- Dihidroartemisinina–Piperaquina (DHA+PPQ)

2.2 Resistencia a los antimaláricos.

“La resistencia a antimaláricos se define como la capacidad de una población parasitaria de sobrevivir y/o multiplicarse a pesar de la administración y absorción de un fármaco en dosis iguales o superiores a las habitualmente recomendadas, toleradas por el paciente, siempre que la forma activa del fármaco acceda al eritrocito o al parásito infectado durante el tiempo necesario para su acción correcta” (Bruce-Chwatt y col., 1986). La resistencia a los antipalúdicos se considera hoy uno de los mayores retos para el control de la malaria.

En la aparición de resistencias a fármacos antimaláricos influyen distintos factores, como la endemicidad de la malaria, la inmunidad de la población (Artzy-Randrup y col., 2010) y la densidad parasitaria de la infección (Hastings y col., 2004), pero el factor que favorece la

dispersión de las resistencias es la presión farmacológica, por la ventaja selectiva que tienen las cepas resistentes en presencia del fármaco (Barnes y col., 2005).

En *P. falciparum* se ha descrito resistencia a todos los antimaláricos usados actualmente, incluso a las artemisininas, con amplias variaciones en la distribución geográfica (Costanzo y col., 2011). Otra especie que ha experimentado un rápido desarrollo de resistencia a CQ y SP en zonas de África, sureste asiático, Pacífico, sur América es *P. vivax* (Douglas y col., 2010; Mula y col., 2011; Kuesap y col., 2011). Se han comunicado casos aislados de resistencia a cloroquina en *P. malariae* (Siswantoro y col., 2011). Se habla de multirresistencia cuando existe resistencia a más de dos fármacos de distinta familia química (Wongsrichanalai y col., 2002).

Los mecanismos resistencia han sido descritos en el caso de la cloroquina, los antifolatos y la atovacuona. El hecho de que los mecanismos de acción de muchos antimaláricos no sean bien conocidos dificulta también la comprensión de los mecanismos implicados en la resistencia a dichos fármacos. Se han establecido probables o hipotéticos mecanismos que intervienen en la aparición de resistencia, en general relacionados con alteraciones en distintos transportadores, localizados fundamentalmente en la vacuola digestiva del parásito, que alteran las concentraciones de los fármacos en su posible lugar de acción (Bloland 2001; Petersen y col., 2011).

A) Resistencia a la cloroquina (CQ): la digestión y degradación de la hemoglobina por parte del parásito, produce grandes cantidades de un producto tóxico, la hemina, que es polimerizado por el parásito, produciendo hemozoína (denominado pigmento malárico, por su aspecto característico al ser observado al microscopio óptico). La CQ inhibe la formación de la hemozoína y provoca la acumulación de la hemina, que tiene un efecto letal para el parásito. El mecanismo de resistencia de *P. falciparum* a la CQ parece asociado a un aumento de la expulsión del fármaco desde el interior de la vacuola digestiva (figura 4), mediado fundamentalmente por el transportador PfCRT, en el que también están implicados otros transportadores, como el PfMDR1 (*P. falciparum* Multi Drug Resistance 1) (Foley y col., 1997).

B) Resistencia a amodiaquina (AQ): molécula estructuralmente similar a la CQ, se cree que, igual que ésta, actúa inhibiendo la destoxificación de la hemina. El mecanismo de resistencia parece estar asociado también a un aumento de la expulsión del fármaco desde el interior de la vacuola parasitaria (figura 4).

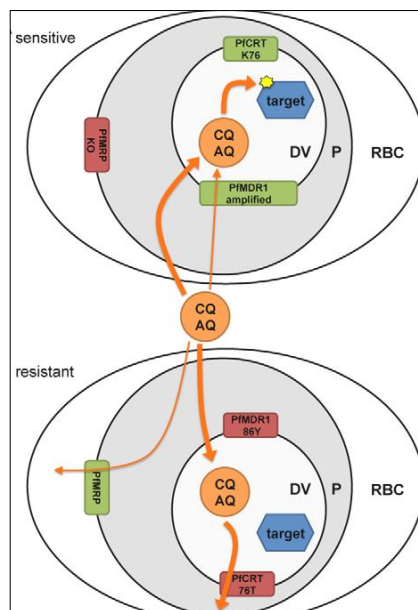


Figura 4.- Mecanismo de acción de la cloroquina y amodiaquina. Aparecen los transportadores PfMDR1 y PfCRT. En la parte inferior, hipotético mecanismo de resistencia (figura de Petersen y col., 2011)

C) Resistencia a mefloquina (MQ): su mecanismo de acción se desconoce. Ejerce alguna actividad antipalúdica inhibiendo la destoxificación de la hemina, pero su acción principal parece situarse en el exterior de la vacuola digestiva, en el citoplasma del parásito, donde se encuentra su diana. La resistencia se ha asociado fundamentalmente con un aumento de la introducción de la molécula al interior de la vacuola digestiva mediado por el transportador PfMDR1 (figura 5), de tal forma que disminuye la concentración del antimalárico en el escenario donde se encuentra su diana.

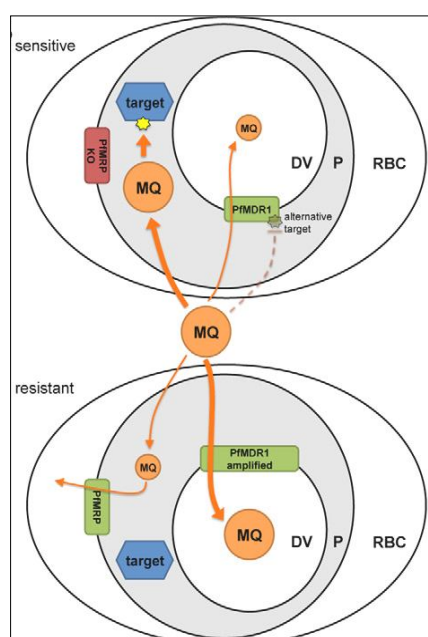


Figura 5.- Mecanismo de acción de la mefloquina. En la parte inferior de la figura, el posible mecanismo de resistencia (figura de Petersen y col., 2011)

D) Resistencia a las artemisininas: el mecanismo de acción preciso de las artemisininas también es poco conocido. La resistencia a estos compuestos se produce por un descenso de su concentración en el citoplasma del parásito, por su paso al interior de la vacuola digestiva, debido a un aumento del flujo a través del transportador PfMDR1. También está implicado un transportador ATPasa dependiente de Ca^{2+} (PfATP6), que aumenta la expulsión del fármaco fuera del parásito, al citoplasma del eritrocito (figura 6).

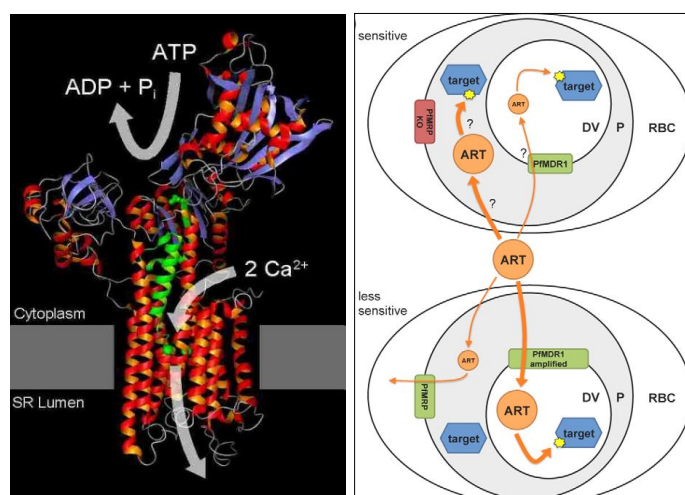


Figura 6.- En la imagen de la izquierda, estructura tridimensional del PfATP6. A la derecha, mecanismos de acción y resistencia de artemisininas (figura de Petersen y col., 2011)

E) Resistencia a la combinación sulfadoxina/pirimetamina (SP): el ácido fólico es un factor esencial en la síntesis de DNA del parásito. La combinación de sulfadoxina / pirimetamina, actúa de manera secuencial y con un efecto sinérgico, inhibiendo competitivamente dos enzimas que intervienen en la síntesis de los folatos. La pirimetamina inhibe el enzima dihidrofolato reductasa, (DHFR), y la sulfadoxina el paso mediado por el enzima dihidropteroato sintetasa, (DHPS). (Bruce-Chwatt, 1986). Una serie de mutaciones puntuales en los genes que codifican ambas enzimas (dihidrofolato reductasa (*pf dhfr*) y dihidropteroato sintetasa (*pf dhps*)) desencadenan la aparición de resistencia a la combinación (figura 7).

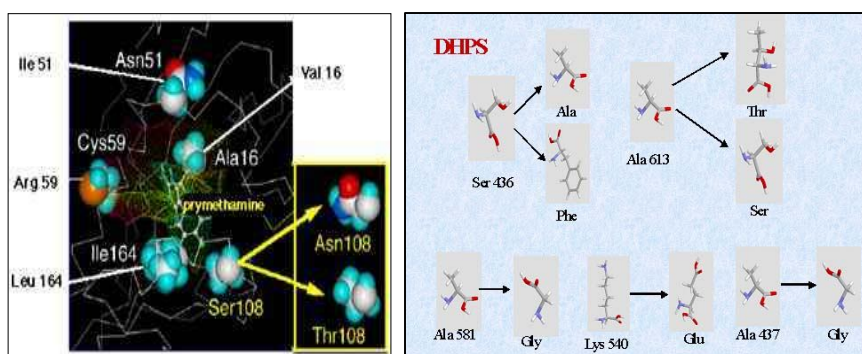


Figura 7.- Puntos de mutación en las proteínas PfDHFR Y PfDHPS, que confieren a los parásitos resistencia a la sulfadoxina/ pirimetamina.

F) Resistencia a la atovacuona (AVQ): este antipalúdico actúa inhibiendo el transporte electrónico del complejo del citocromo *bc1*, localizado en la membrana interna de la mitocondria del parásito (Ittarat y col., 1994). La resistencia aparece por una alteración en el lugar de unión de la molécula al citocromo *bc1* (figura 8). Se desarrolla muy rápidamente cuando se usa solo, por lo que siempre se combina con proguanil.

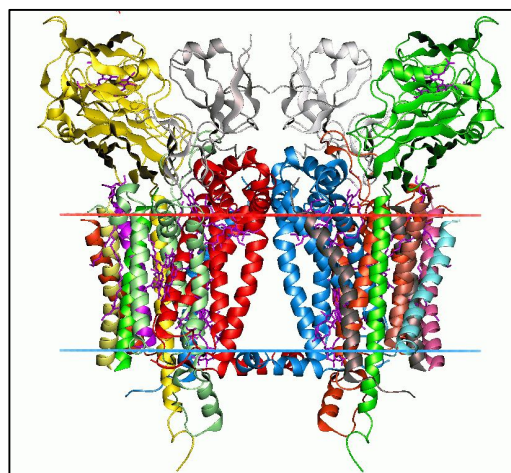


Figura 8.-Estructura tridimensional del citocromo bc1

2.3 Aparición y difusión de la resistencia a los antimaláricos.

La cloroquina fue adoptada como tratamiento de malaria tras la segunda guerra mundial. La resistencia a este antipalúdico aparece por primera vez a los diez años de comenzar a ser usado. El nivel de resistencia llegó a ser tan elevado tras 50 años de uso ininterrumpido, que fue sustituida por una combinación nueva, SP, que es adoptada como primera línea de tratamiento en muchos países endémicos. La resistencia a este antimalárico aparece en algunas regiones tras dos años de uso intensivo (Wellems y col., 2001).

Las mutaciones de resistencia tanto a CQ como a SP se describen por primera vez en el Sureste Asiático y en focos aislados de América del sur. Posteriormente se extienden al continente africano, primero a la región oriental, desde donde se dispersan hacia el sur y centro del continente y más tarde a la región occidental.

Una selección natural positiva produce una reducción en la diversidad genética alrededor de los loci de resistencia. El estudio de estos loci ha permitido establecer el origen y la dispersión de las resistencias desde el sureste asiático hasta África, así como identificar la evolución a nivel local y definir estructuras poblacionales entre parásitos de África, América y Asia (Mita, 2010).

Con el desarrollo de resistencias a CQ y SP se fueron introduciendo nuevos antimaláricos, incluyendo AQ, MQ y quinina (Q). La aparición de resistencias a estos antimaláricos, se ha producido en un periodo de tiempo corto (en algunos casos en tan solo un año), desde la

introducción del nuevo antimalárico hasta la detección de los primeros casos de resistencia. Hasta el 2001 la distribución de resistencias era como aparece en la figura 9, con zonas de emergencia de multi-resistencia, en el sureste de Asia y América del sur. Actualmente el tratamiento más efectivo para la malaria se basa en las ACTs. Pero, tras una década de uso extendido de éstas, la resistencia a artemisininas está ya bien establecida en algunas regiones del sureste asiático (figura 10), relacionada fundamentalmente con el uso en monoterapia que se ha hecho del artesunato sin supervisión médica.

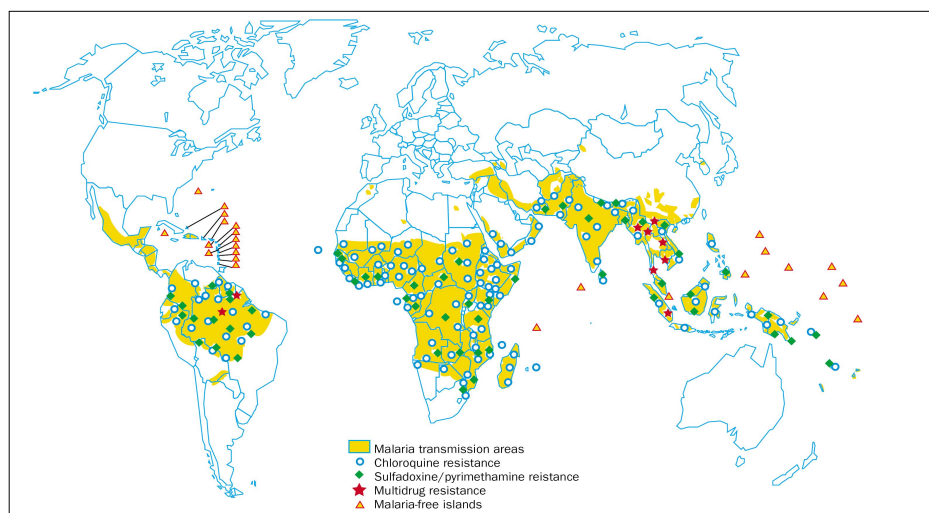


Figura 9.- En la figura aparece destacadas las zonas donde ya se detectan casos de multiresistencia en 2001 (WHO/ CDS/RBM/2001.33)

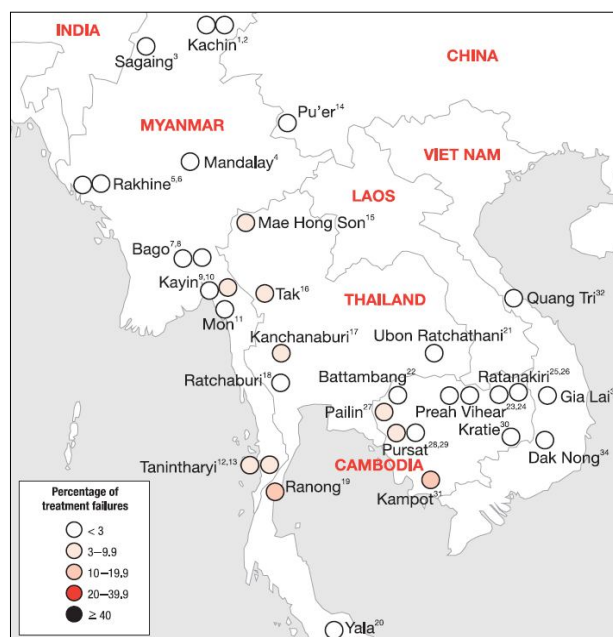


Figura 10.- Resistencia a artemisininas: Fallo terapéutico entre el 10% y 19% en estudios in vivo realizados entre 2006 y 2009, en focos de Tailandia, Camboya y Mianmar (WHO

2.4 Estudio de la resistencia a los antimaláricos

Se emplean cuatro métodos para el estudio y detección de resistencias: estudios *in vivo*, estudios *in vitro*, estudios de farmacocinética y farmacodinámica y estudios de mutaciones en distintos genes implicados en la resistencia a los antipalúdicos.

- A) **Estudios *in vivo*:** son actualmente la referencia en la monitorización y control de las resistencias. La disminución de la eficacia terapéutica de un fármaco puede ser enmascarada por la eliminación de parásitos realizada por el sistema inmune en pacientes con una alto grado de inmunidad adquirida (White, 1997). Para disminuir el efecto de la inmunidad en el estudio de la eficacia terapéutica de un fármaco, los estudios *in vivo* se realizan en niños menores de 5 años. Consisten en el seguimiento, clínico y parasitológico, de pacientes con malaria no complicada tratados con dosis conocidas de un determinado fármaco. Estos estudios se complementan con la determinación de los marcadores moleculares que permiten diferenciar reinfecciones, frecuentes en países endémicos de malaria, de las recrudescencias de una cepa en concreto, reflejo de una verdadera resistencia (Charle y col., 2009).
- B) **Estudios *in vitro*:** para su realización se toman muestras de sangre periférica parasitada y se expone a los parásitos a distintas concentraciones de antipalúdicos en placas de micro ensayo, comprobando si se produce la inhibición de la maduración de los esquizontes (Folarin y col., 2011). Estos estudios presentan la limitación de no valorar la farmacocinética y farmacodinámica del antimalárico. En este tipo de estudios se evitan algunos factores que influyen en las pruebas *in vivo*, ya que en este caso se valora solamente el efecto del tratamiento sobre el parásito, sin tener en cuenta la acción del sistema inmune del paciente.
- C) **Estudios de farmacocinética y farmacodinámica:** realizados para determinar la absorción, distribución, metabolismo y eliminación del fármaco, considerando variaciones interindividuales. Son esenciales para poder establecer si el fallo del tratamiento se debe a una resistencia verdadera o se debe a otras causas, como la administración de una dosis incorrecta del fármaco (Onyamboko y col., 2011).
- D) **Técnicas moleculares:** Se conocen en el genoma del parásito mutaciones relacionadas con la resistencia, pero su papel en la resistencia real es complejo, pues su presencia no siempre se corresponde con fracaso del tratamiento, es decir, un genotipo de resistencia no es siempre un fenotipo de resistencia, ya que en este último están implicados otros factores como la inmunidad adquirida frente a la malaria del huésped. Los estudios con marcadores moleculares utilizan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para

detectar la presencia de mutaciones que se relacionan con la resistencia biológica a los antipalúdicos (Plowe y col., 1995).

2.5 Perspectivas del tratamiento

Entre las principales causas de la aparición de la resistencia están el uso de dosis infraterapéuticas del fármaco y su uso en monoterapia. Los derivados de artemisininas están disponibles en monoterapia en muchos países, y son usados en el tratamiento de la malaria no complicada, lo que puede comprometer el éxito de ACTs.

- Se han detectado índices de fracaso del tratamiento con AS+AQ en África superiores al 10% en estudios *in vivo*, nivel en el que está recomendado cambiar el tratamiento. En algunas regiones este fracaso se ha atribuido al uso indebido del AS en monoterapia, cuando los pacientes suprimen la AQ, debido a sus efectos secundarios. Esto ocurre más a menudo en lugares donde no se utiliza una presentación coformulada (Zwang y col., 2009).
- Los índices de fallo terapéutico con la combinación AS+SP son altos en zonas donde la resistencia a SP es alta. Además, ésta es la única de las cinco combinaciones en las que no existe presentación coformulada (Hamour y col., 2005).
- La combinación AS+MQ mantiene una alta eficacia en América y Asia, pero menos en el sureste asiático, donde la mefloquina se ha usado previamente en monoterapia y donde la resistencia a la combinación podría estar emergiendo (Rogers y col., 2009).
- La combinación AL continúa siendo muy eficaz, aunque en África se ha observado un aumento de reinfecciones por cepas con alelos salvajes para las mutaciones relacionadas con la cloroquina (Zongo y col., 2007) tras el tratamiento en algunas regiones, lo que hace necesaria la vigilancia.
- La combinación DHA+ PPQ tiene una alta eficacia, aunque la valoración del impacto de su uso debe esperar, ya que ha sido la última de las ACTs introducidas en las políticas de tratamiento. Dada su prolongada vida media parece prevenir los episodios de reinfecciones de forma más eficaz que otras combinaciones (Ratcliff y col., 2007).

No existen actualmente otros antimaláricos disponibles con la misma eficacia y tolerabilidad que las ACTs, y existen pocas alternativas para un futuro próximo (WHO, 2010).

3. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA MALARIA

El plasmodio está en constante evolución. Su plasticidad y diversidad genética le permiten, por una parte, desarrollar resistencia a antimaláricos y, por otra, evadir la respuesta del sistema inmune del hospedador, principal obstáculo en el diseño de una vacuna eficaz, por lo que la enfermedad continua siendo una de los principales desafíos de salud pública a nivel mundial (“The malaria genomic epidemiology network”, 2008).

3.1 Variabilidad genética y multiplicidad de infección

Las infecciones por *P. falciparum* están causadas por poblaciones genéticamente distintas. (“The malaria genomic epidemiology network”, 2008). Esa variabilidad genética se ha estudiado analizando genes como *pfmsp1* y *pfmsp2*, que codifican las proteínas de superficie del merozoito 1 y 2 respectivamente, (MSP1 y MSP2). También se han utilizado otros genes de variabilidad como *pfglurp*, que codifica la proteína rica en glutamina (GLURP), *pftrap*, que codifica la proteína relacionada con la adhesión a la trombospodina (TRAP), etc (Sallenave-Sales y col., 2000).

En la actualidad se conoce que *P. vivax* tiene el mismo comportamiento que *P. falciparum*, es decir, que produce infecciones multipoblacionales (Dias y col., 2011). Esta variabilidad genética se puede observar tanto en el hombre como en el mosquito.

La detección de los distintos genotipos presentes en una infección puede realizarse mediante el uso de PCR (Snounou y col., 1993; Robert y col., 1996). Sin embargo, los genotipos detectados en un paciente en un momento dado pueden ser sólo parte de los genotipos presentes en la infección. Si se realizan tomas de muestras consecutivas al paciente se pueden detectar cambios en la mezcla de genotipos. Esto se debe a fenómenos de secuestro de la población de parásitos, lo que limita la posibilidad de establecer un perfil de las infecciones (Kiwanuka, 2009). La cuantificación de las distintas poblaciones presentes en una infección se realiza habitualmente mediante el índice de multiplicidad de la infección o índice MOI (Multiplicity Of Infection) o número total de alelos diferentes encontrados en una infección (Mayengue y col., 2011).

La base de la diversidad genética es esencialmente el proceso de recombinación genética que se produce durante la reproducción sexual del parásito en el mosquito, pero también existe recombinación intragénica durante la mitosis del parásito en el hombre, que contribuye a esta diversidad (Rich y col., 2000; Hoffmann y col., 2003). La estructura y complejidad de las infecciones por *Plasmodium* spp. no es uniforme en distintas regiones de malaria, sino que depende de factores locales relacionados con el parásito, el vector, el huésped y el nivel de transmisión (Schultz y col., 2010). Además en algunos estudios tanto el número de MOI como la presencia

concreta de algunas poblaciones se han relacionado con la mayor o menor gravedad de la infección (Anong y col., 2010).

A) Diversidad y transmisión: la variabilidad genética en un área determinada parece estar relacionada con el nivel de transmisión. Se ha detectado una elevada prevalencia de multiplicidad de infecciones en estudios en zonas de hiper u holoendemicidad. Las infecciones en regiones holoendémicas de África presentan proporciones elevadas de genotipos múltiples (Cano y col., 2007). Las infecciones en América del sur tienen menor número de poblaciones, similares a las que aparecen en el sureste Asiático (Ghanchi y col., 2010). En estos casos sólo un número de genotipos idénticos han sido encontrados en áreas de baja transmisión como Brasil. (Ferreira y col., 1998; Hoffmann y col., 2001). En áreas de transmisión elevada pero inestable o estacional, donde la mayor parte de casos aparecen en la estación lluviosa coincidiendo con la mayor densidad de vectores, se han detectado densidades parasitarias y genotipos fluctuantes en infecciones crónicas (Nassir y col., 2005; Dent y col., 2009).).

B) Diversidad edad e inmunidad: Los datos referidos a la relación del MOI con la edad, y por tanto con la inmunidad adquirida frente a la malaria, son contradictorios. En algunos estudios el número de genotipos que se encuentra infectando a un individuo parece disminuir con la edad, a medida que se va desarrollando la inmunidad adquirida frente a la malaria, es decir, a medida que aumentan los anticuerpos frente al parásito (Omosun y col., 2005; Guerra-Neira y col., 2006), en otros no se encuentra ninguna relación entre la edad y la multiplicidad de la infección y el aumento del MOI se relaciona con la endemicidad de la malaria (Zwetyenga J y col., 1998; Färnet y col., 1999; Vafa y col., 2008,). La baja multiplicidad de infección encontrada en adultos se ha relacionado con bajas densidades parasitarias más que con la inmunidad específica (Mayor y col., 2007).

C) Diversidad y morbilidad: se han asociado ciertos tipos alélicos de *pfmsp1* y *pfmsp2* con la morbilidad. Por ejemplo, el tipo FC27 de *pfmsp2* resultó ser más frecuente en individuos asintomáticos que en sintomáticos (Beck y col., 1997) y el tipo 3D7 presentó una mayor protección frente a la aparición de sintomatología (Al Yaman y col., 1997). La diferencia en la clínica para FC27 ha sido explicada por las diferentes respuestas inmunes que desencadenan las proteínas que codifican estos alelos (Beck, 1999). La malaria grave ha sido relacionado con el tipo de *pfmsp1*-RO33 en Senegal (Robert y col., 1996), con el *pfmsp1*-K1 en Gabón (Kun y col., 1998) y con *pfmsp2*-FC27 en Papúa Nueva Guinea (Al Yaman y col., 1997).

3.1.1 Marcadores moleculares para el estudio de la diversidad de poblaciones de *P. falciparum*

Los marcadores más utilizados para conocer la variabilidad poblacional de *P. falciparum*, son los genes *pfmsp1* y *pfmsp2*, que codifican las proteínas de superficie del merozoíto 1 y 2. Estas proteínas parecen jugar un importante papel como mediadoras de la invasión del eritrocito en la infección (Roy y col., 2008). Se encuentran situadas en la superficie extracelular del merozoíto y muestran un alto grado de variabilidad antigénica, que parece relacionada con la presión del sistema inmune del hospedador humano (Takala y col., 2009). Estas proteínas han sido utilizadas en distintos estudios de desarrollo de vacunas (Sutton y col., 2010).

A) Gen de la Proteína de Superficie del Merozoíto 1 (*pfmsp1*)

Este gen, que codifica la proteína MSP1, se localiza en el cromosoma 9. El gen se divide en 17 bloques según los niveles de divergencia en la secuencia de aminoácidos que aparecen en las proteínas codificadas por él. Los bloques se clasifican en bloques conservados (similitud de aminoácidos del 87-97%); bloques semiconservados (similitud de aminoácidos del 65-77%); bloques variables (similitud de aminoácidos del 13-38%). Secuencias repetitivas en los bloques variables pueden ser agrupadas en 2 familias alélicas, K1 y MAD20 (Tanabe y col., 1987). El bloque 2 presenta una excepción a este dimorfismo, ya que en él se puede encontrar una secuencia no repetitiva, denominada RO33, que constituye una tercera familia alélica (Roy y col., 2008). Además está descrita una cuarta familia, resultado de la recombinación entre alelos de MAD20 y RO33, denominada MR. (Takala y col., 2002) (figura 11). La diversidad genética en el gen *mSP1* se origina por recombinación genética durante los procesos de meiosis. Este parece ser el mecanismo de mayor importancia en áreas de alta transmisión de malaria, mientras que recombinaciones en mitosis parecen ser el mecanismo fundamental en la aparición de nuevos alelos en zonas de intermedia y baja transmisión (Hoffmann y col., 2003).

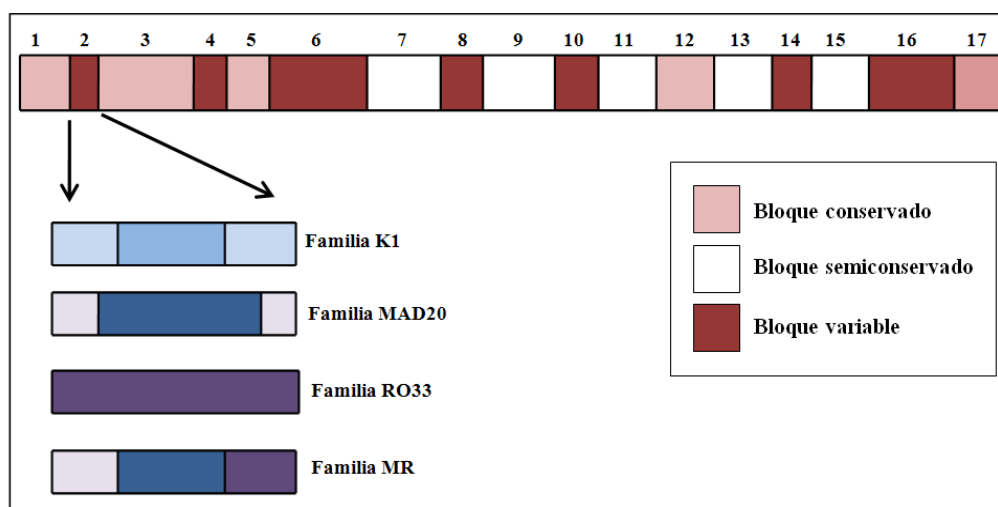


Figura 11.- Esquema del gen *pfmsp1*, donde aparece la diversidad del bloque 2 (19KDa) sobre el que están diseñadas las PCRs utilizadas en este estudio. Aparecen indicadas las cuatro familias alélicas (K1, MAD20, RO33 y MR).

La proteína MSP1 es la más abundante de la superficie del merozoíto. Se sintetiza como un precursor de 190KDa que es escindido en 4 fragmentos, que forman un complejo (glicosilfosfatidilinositol) Este complejo permanece anclado en la superficie del merozoíto y, salvo su extremo carboxiterminal, de 19 KDa (MSP1₁₉), es liberado antes de la invasión del eritrocito. El MSP1₁₉ contiene dos factores de crecimiento epidérmico (EGF-like), que parecen ser determinantes en la invasión del eritrocito. (Takala y col., 2006). Los anticuerpos frente a MSP1₁₉ pueden inhibir la invasión del eritrocito y se asocian con protección frente a la malaria clínica. MSP1₁₉ es una estructura muy conservada, lo que junto con su posible función en la patogenia de la infección la hace especialmente atractiva en el diseño de vacunas (Takala y col., 2007).

B) Gen de la Proteína de Superficie del Merozoito 2 (*pfmsp2*)

El gen que codifica esta proteína se encuentra situado en el cromosoma 2 de *P. falciparum*. Es también una glicoproteína polimórfica, cuyo tamaño varía de 45 a 55 Kda. EL gen *mSP2* presenta el mismo dimorfismo que el gen *mSP1* pero presenta mayor variabilidad (Hoffmann y col., 2001). El gen *pfmsp2* se divide en dos familias alélicas, FC27 y 3D7, y está constituido por cinco bloques: uno variable, dos semiconservados y dos conservados. (Roy y col., 2008) (figura 12).

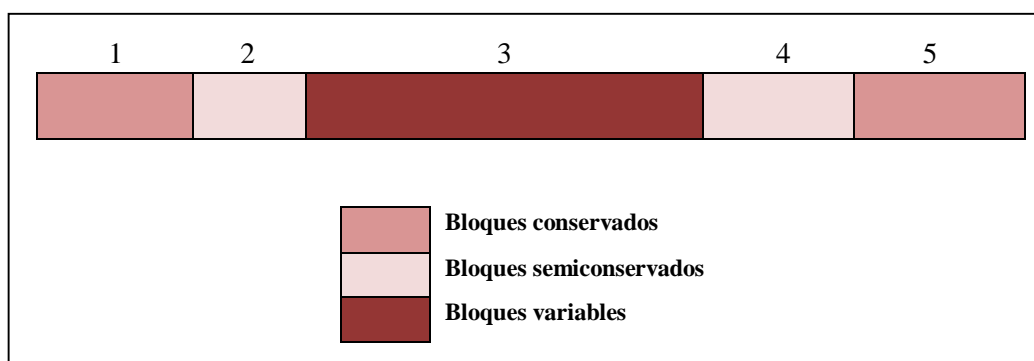


Figura 12.- Esquema del gen *pfmsp2*, donde aparecen indicados los bloques conservados, semiconservados y variables en los que se encuentra estructurado el gen.

El análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa o PCR de los bloques variables de los genes *pfmsp1* y *pfmsp2* da como resultado fragmentos de amplificación de distinto tamaño (medido en pb), en función del número de veces que están o no repetidas las secuencias.

Los estudios de variabilidad genética pueden ser aplicados para el conocimiento de:

- El número de poblaciones del parásito que se encuentran en el hombre en el momento de la toma de la muestra hombre (Kiwanuka, 2009).
- La variabilidad del parásito en el hospedador humano y en el mosquito y determinar qué parásitos son transmitidos del vector al hombre y cuáles saltan de éste al mosquito (Huber y col, 1998; Nakazawa y col., 2011).
- La eficacia terapéutica de antipalúdicos, para determinar si los casos de resistencia detectados en el terreno, son resistencias reales o se trata de reinfecciones. Para ello se comparan las poblaciones que se encuentran en el paciente el día 0 de la toma de muestra, con las poblaciones que aparecen el día que se clasifica como posible resistencia al tratamiento (Liljander y col., 2009).
- El desarrollo de vacunas (Lyon y col., 2008).

3.2 Marcadores moleculares de resistencia a los antimaláricos

La caracterización de la base molecular de la resistencia en *P. falciparum* es extremadamente compleja (Su y col., 1997). Se han identificado varios genes como marcadores moleculares de resistencia que incluyen mutaciones puntuales en el gen *pf dhfr*, asociadas a resistencia a pirimetamina; mutaciones puntuales en el gen *pf dhps*, asociadas a resistencia a sulfadoxina; mutaciones puntuales en el gen *pf crt*, mutaciones puntuales y aumento del número de copias en el gen *pf mdr1*, asociados a resistencia a cloroquina, amodiaquina, lumefantrina, mefloquina, entre otros, y mutaciones puntuales en el gen *pf cytb* asociadas a resistencia a la atovacuona.

La asociación entre las mutaciones y la resistencia a los fármacos es difícil, especialmente cuando la resistencia incluye más de un locus y múltiples mutaciones.

El estudio de las mutaciones puntuales en estos genes implicados en la resistencia a distintos antipalúdicos, se puede realizar mediante la técnica PCR-RFLPs (“Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragments Length Polymorphism”). Estas técnicas moleculares quedan ampliamente explicadas en el apartado de Materiales y Métodos de la Tesis.

A.- Mutaciones en los genes *pf dhfr* y *pf dhps*: tienen relación con la resistencia a los antifolatos (Peterson y col., 1990). La epidemiología de las mutaciones en estos genes ha sido ampliamente estudiada. El desarrollo de mutaciones en el gen *pf dhfr*, localizado en el cromosoma 4 y en el gen *pf dhps*, localizado en el cromosoma 8, ha estado relacionados con el uso previo de sulfadoxina/ pirimetamina en un área determinada (Plowe y col., 1997; Wang y col., 1997; Sridaran y col., 2010). Las mutaciones de ambos genes aparecen indicadas en la tabla 1.

<i>pfdhfr</i>		
Posición	Aminoácido salvaje	Aminoácido mutado
51	Asn (N)	Ile (I)
59	Cis (C)	Arg (R)
108	Ser (S)	Asn (N)
164	Ile (I)	Leu (L)

<i>pfdhps</i>		
Posición	Aminoácido salvaje	Aminoácido mutado
436	Ser (S)	Fen (F)
437	Ala (A)	Gli (G)
540	Lis (K)	Glu (E)
581	Ala (A)	Gli (G)

Tabla 1.– Posiciones en las que se detectan mutaciones en los genes *pfdhfr* y *pfdhps*. Se indica el aminoácido salvaje y el aminoácido mutado.

B.- Mutaciones en los genes *pfcr* y *pfmdr1*: el gen que codifica el transportador de cloroquina asociado a resistencia (*pfcr*) se encuentra localizado en el cromosoma 7 y el gen que codifica el transportador asociado a multirresistencia (*pfmdr1*), se encuentra localizado en el cromosoma 5 (Nkhoma y col.,2007). Mutaciones en estos genes se han asociado con resistencia a cloroquina (Khalil y col., 2005), lumefantrina (Sisowat y col., 2009), amodiaquina (Folarin y col., 2011), mefloquina (Rogers y col., 2009) y piperquina. Las mutaciones de ambos genes aparecen indicadas en la tabla 2.

<i>Pfcr</i>		
Posición	Aminoácido salvaje	Aminoácido mutado
76	Lis (K)	Tre (T)

<i>pfmdr1</i>		
Posición	Aminoácido salvaje	Aminoácido mutado
86	Asn (N)	Tir (Y)
1246	Asp (D)	Tir (Y)

Tabla 2.– Posiciones en las que se detectan en los genes *pfcr* y *pfmdr1* mutaciones. Se indica el aminoácido salvaje y el aminoácido mutado.

C.- Mutaciones en el gen *pfcytb1*: existen mutaciones en el gen mitocondrial *pfcytb1* (citocromo b6 de *P. falciparum*), localizado en el cromosoma 1, que están relacionadas con la resistencia a la autovacuona. (Ekala y col, 2007; Pimentel y col., 2006).

D.- Aumento del número de copias génicas: la resistencia a artemisininas se describió en el año 2007 y se ha asociado a un mayor número de copias en el gen *pdmdr1* y a mutaciones en el gen *pfatp6* (Alker y col., 2007; Dondorp y col, 2009). Por otra parte, la resistencia a mefloquina se ha asociado con un aumento de copias del gen *pfmdr1* (Rogers y col., 2009).

Una vez que se ha realizado una revisión a nivel epidemiológico, de tratamiento, de resistencias así como de variabilidad genética del parásito, introducimos el siguiente apartado donde hablamos de la situación geográfica, y de la malaria en Guinea Ecuatorial. El capítulo III de la Tesis Doctoral está basado exclusivamente en aislados procedentes de este país.

4. GUINEA ECUATORIAL

La República de Guinea Ecuatorial, con una extensión de 28.051 Km², está situada en África Central, en el Golfo de Guinea. El país está formado por una región insular y una región continental. La región insular está constituida por la isla de Bioko, donde se localiza la capital del país, Malabo, a 45 Km de la costa de Camerún, y las islas de Annobón, Corisco y Elobey, en el Atlántico sur, frente a la costa de Gabón. La región continental, Río Muni, limita, al norte, con Camerún, y al sureste con Gabón (figura 12).



Figura 13.- Situación geográfica de Guinea Ecuatorial en el continente africano y mapa de la división territorial del país

Guinea Ecuatorial es una zona hiperendémica de malaria, con una tasa de inoculación entomológica entre 40 y 100 picaduras/ persona / año. Hay una transmisión estable durante todo el año, de marzo a diciembre en Malabo, y durante los doce meses en Bata, con fluctuaciones estacionales (<http://www.rbm.who.int/>). *Anopheles gambiae* es el principal vector transmisor de malaria, aunque otras especies como *A. funestus* actúan también como vectores. (Kleinschmidt y col, 2006).

El 97% de los casos de malaria se producen por *P. falciparum*, un 3% por *P. malariae* y *P. ovale* se detecta en escaso número. En trabajos recientemente publicados (Rubio y col., 1999; Mendes y col., 2011), se ha registrado la presencia ya de *P. vivax* en el país, tanto en el hombre como en la población vectora.

El número de habitantes estimado en el país es de 1.014.999 en el año 2.010. Casi la mitad de la población tiene menos de 15 años. La esperanza de vida es de 53 años para los hombres y 54 años para las mujeres. La mortalidad infantil (niños menores de 5 años) es de 93/1000. La malaria es la primera causa infecciosa de muerte infantil y es la segunda causa de muerte en el país en todos los grupos de edad (11% de la mortalidad del país). Entre las patologías infecciosas más prevalentes en la población se encuentran, además de la malaria, el VIH/sida, la tuberculosis y la fiebre tifoidea. Al encontrarse el país en una zona de transmisión estable a lo largo del año, la población sufre sucesivas infecciones de malaria, lo que hace que los adultos presenten una cierta inmunidad adquirida. Los grupos más vulnerables son los niños menores de 5 años y las mujeres embarazadas.

En el año 1987 se describió por primera vez la resistencia de *P. falciparum* a cloroquina (Alvar y col., 1987). En 1992 los niveles de resistencia alcanzaban el 40-55%, con unos índices de fracaso terapéutico del 25% que aumentaron al 40% en 1999. El índice de fracaso terapéutico con SP era del 16% en 1995, aunque en 1999 era del 10% (Benito y col., 1995; Roche y col., 2003), sin embargo, el aumento de la resistencia a SP fue progresivo a partir del año 2000. Tras varios estudios para valorar la eficacia de nuevas combinaciones alternativas, en el año 2007, siguiendo las recomendaciones de OMS, se realizó un cambio en el protocolo de tratamiento de la malaria, adoptándose como primera línea la combinación AS+AQ (Charle y col., 2.009).

Según datos de OMS (<http://www.rbm.who.int/>) la situación del país en cuanto a las estrategias de lucha contra la malaria en el año 2010 era la siguiente:

- La distribución a la población de telas mosquiteras impregnadas se cumplió en un 87%, respaldado por una importante campaña de sensibilización.
- El rociamiento domiciliario bianual con piretroides y carbamatos alcanzó el 70%.
- Los test de diagnóstico rápido de malaria se emplearon en un 59% de los casos diagnosticados.
- El acceso al tratamiento fue de un 96%.

- El 87% de las mujeres embarazadas recibieron terapia preventiva intermitente con SP al menos dos veces durante el embarazo.

Los datos de los efectos de la realización de estas estrategias de control en la incidencia de la infección en el país en los últimos años, se basan fundamentalmente en trabajos realizados en la isla de Bioko y refieren una disminución de la prevalencia de parasitemia en niños del 42% al 18% (Kleinschmidt y col., 2009).

1. OBJETIVO GENERAL

Estudio de la prevalencia de marcadores moleculares asociados a resistencia a antimaláricos y su relación con la presentación clínica y con la diversidad genética en aislados africanos de *P. falciparum*.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descripción de la prevalencia de mutaciones asociadas a resistencia a antimaláricos en aislados de *P. falciparum* procedentes de África en un periodo de 8 años (2002-2010), durante la fase de transición entre el uso de sulfadoxina/ pirimetamina y el tratamiento con terapias combinadas con artemisininas en el continente. Estudio del impacto del cambio de tratamiento.
2. Estudio, en pacientes con distinto perfil de inmunidad adquirida frente a la malaria, de la relación entre la presencia de parásito con mutaciones asociadas a resistencia y la presentación clínica y analítica de la infección por *P. falciparum*.
3. Análisis de la variabilidad genética en aislados de *P. falciparum* procedentes de Guinea Ecuatorial y su relación con marcadores moleculares asociados a resistencia.

1. MUESTRA BIOLÓGICA

Para el presente trabajo se utilizaron aislados de *P. falciparum* de pacientes que procedían de distintos países africanos. Las muestras se distribuyeron entre los dos periodos de recogida de las mismas (2002-2006 / 2008-2010) y así como por regiones africanas, en función del país de procedencia (figura 14) En total se recogieron muestras de 18 países africanos que se agruparon en 3 regiones según metodología de la OMS:

- **África Oriental:** Etiopía, Republica de Tanzania, Uganda y Mozambique.
- **África Central:** Guinea Ecuatorial, Gabón, Camerún, República Democrática del Congo, Republica Central Africana y Angola (este país OMS lo clasifica como África del Sur, pero por proximidad geográfica y por ser el único país de esta área se decidió incluir en África Central).
- **África Occidental:** Sierra Leona, Burkina Faso, Costa de Marfil, Senegal, Mali, Guinea Bissau, Nigeria y Ghana.

En total se seleccionaron 200 aislados de *P. falciparum* de 200 pacientes que llegaron al Hospital Carlos III de Madrid (la procedencia de uno de ellos no se conoce). Para la realización del estudio del capítulo II se analizaron todas las muestras como un conjunto, pero para el capítulo I y III las muestras fueron analizadas en función de los dos periodos de tiempo en los que quedaron las muestras distribuidas (2002-2006/ 2008-2010).

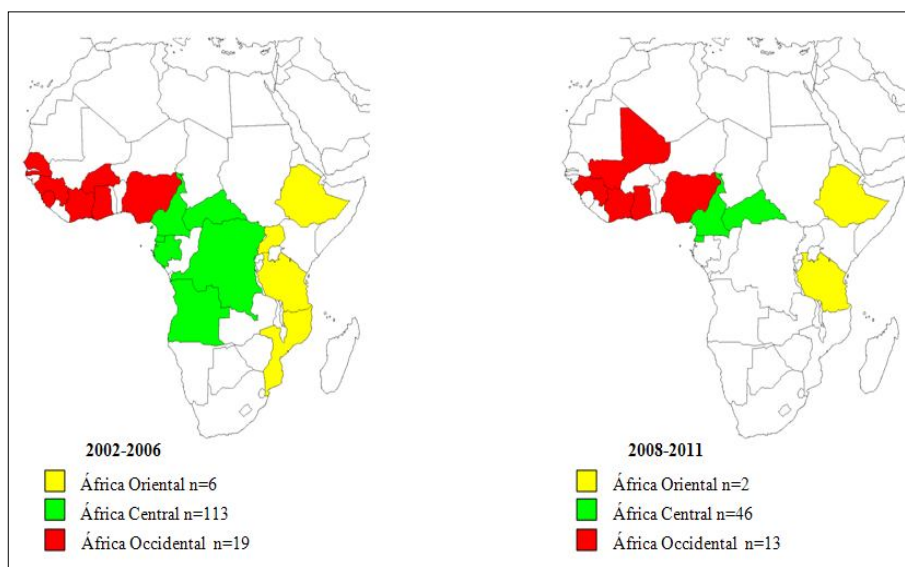


Figura 14.- Distribución de los pacientes por regiones africanas de procedencia

2. DATOS

De todos los pacientes en los que se aisló el parásito, se recogieron los siguientes datos epidemiológicos, clínicos y analíticos.

- Fecha de recogida de la muestra
- Fecha de nacimiento
- Sexo
- País de procedencia
- País de residencia habitual
- Datos clínicos al ingreso
- Datos analíticos al ingreso

3. ANÁLISIS MOLECULAR

3.1 Extracción ADN

El ADN fue extraído a partir de 200 µl de sangre con QIAamp DNA Blood Minikits® (QIAGEN, Hilden, Alemania). Se siguió el protocolo proporcionado por la casa comercial. Este ADN fue utilizado para las distintas técnicas moleculares que se han empleado en la realización de esta tesis doctoral.

3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de malaria

Tras el diagnóstico microscópico, se realizó la confirmación y la identificación a nivel de especie mediante una PCR múltiple para el diagnóstico, que utiliza oligonucleótidos (oligos) diseñados a partir de la subunidad 18s del ADN ribosómico del parásito (Padley y col., 2003). En una única reacción se utilizaron 4 oligos directos, cada uno de ellos específico para cada una de las cuatro especies que se quiere diagnosticar y un oligo inverso, conservado para las 4 especies (tabla 3). Se utilizaron 5 µl de ADN molde de cada muestra, en un volumen final de 25 µl.

Oligos	Secuencia	Especie	Tamaño en pb
I	5'-GTATCTGATCGTCTTCACTCCC-3'		
D	5'-AACAGACGGGTAGTCATGATTGAG-3'	<i>P. falciparum</i>	276
D	5'-CGGCTTGGAAGTCCTTGT-3'	<i>P. vivax</i>	300
D	5'-CTGTTCTTTGCATTCCTTATGC-3'	<i>P. ovale</i>	375
D	5'-CGTTAAGAATAACGCCAAGCG-3'	<i>P. malariae</i>	412

Tabla 3.- PCR múltiple para la detección de *Plasmodium* spp. pb: pares de bases. D: oligo directo; I: oligo indirecto

3.3 PCR-RFLP para la detección de mutaciones puntuales en genes de *P. falciparum* relacionados con resistencia a antimaláricos

Para la caracterización genética de alelos salvajes o mutados de *P. falciparum* presentes en un aislado se realizó un análisis mediante PCR con posterior digestión con enzimas de restricción (RFLP) siguiendo los protocolos descritos por Plowe y col. (http://medschool.umaryland.edu/cvd/2002_pcr_asra.htm).

La PCR es una PCR anidada, donde en una primera reacción se amplifica un fragmento del gen a estudiar (*pfdhfr*, *pfdhps*, *pfcr* y *pfmdr1*) y en una segunda reacción se amplifica un fragmento de menor tamaño, que contiene los codones concretos que se quieren explorar. El revelado del producto amplificado se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio.

El producto de esta segunda reacción se somete a una digestión con enzimas de restricción. La digestión se realiza de manera individual para cada codón, la temperatura a la cual se realiza la restricción es la recomendada por el fabricante para cada enzima. En función de la presencia o ausencia de mutación en los codones problema el fragmento es digerido o no. Los resultados de las digestiones se observan mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2,5% teñido con bromuro de etidio. En caso de que no se haya producido la digestión (el enzima no corta) se observará un fragmento del mismo tamaño que el obtenido en la segunda reacción de PCR; en caso de que se haya producido digestión (el enzima corta), se observarán dos fragmentos de menor tamaño. La interpretación de los resultados, en función de que exista digestión o no, es específica para cada enzima y cada codón.

La amplificación de todas las reacciones de PCR fue realizada en un volumen total de 50µl, utilizando 2µl del ADN molde. La digestión con enzimas de restricción se realizó con 5µl del producto amplificado en la segunda PCR en un volumen total de 20µl.

a.- Gen del enzima Dihidrofolato Reductasa (*pfdhfr*): se encuentra localizado en el cromosoma 4, se analizan la presencia o ausencia de las mutaciones en los codones 51, 59, 108 y 164, relacionadas con resistencia a pirimetamina. Se realizan en total 4 reacciones de PCR, dos para amplificar el fragmento en el que se encuentran los codones 51 y 59 y dos para amplificar el fragmento en el que se encuentran los codones 108 y 164. Posteriormente se realizan 4 digestiones con enzimas de restricción.

Para la detección de las mutaciones puntuales en los codones 51 y 59, en una primera reacción se amplifica un fragmento de 147 pares de bases (pb); en una segunda reacción se amplifica un fragmento de 113pb (tabla 4) donde ya se estudiará la presencia o ausencia de mutaciones en dichas

posiciones. Se realizan dos digestiones, con los enzimas EcoRI, para el análisis del codón 51, y BsrGI, para el análisis del codón 59 (tabla 5).

Para la detección de las mutaciones puntuales en los codones 108 y 164, en una primera reacción se amplifica un fragmento de 414pb; en una segunda reacción se amplifica un fragmento de 254pb (tabla 4). Posteriormente se realizan dos digestiones, con los enzimas AluI, para el análisis del codón 108, y PsiI, para el análisis del codón 164 (tabla 5). El resultado de las electroforesis tanto de la PCR como de las digestiones con enzimas de restricción aparece en la figura 15.

PCR para el gen <i>pfdhfr</i> (cromosoma 4)				
Gen	Reacción	Oligos	Secuencia	pb
<i>pfdhfr</i> - 51/59	1ª	FR519-A	5'-GCGCGCTAATAACTACACATTTA-3'	147
		FR519-B	5'-CCCGGGCTCTTATATTCAATT-3'	
	2ª	FR51-D	5'-TAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGGA-3	113
		FR59-D	5'-ATTTTCATATTTTGATTCATTACATATGTTGTAACGTAC-3'	
<i>pfdhfr</i> - 108/164	1ª	FR100-A	5'-GGGGGGCAGTTACAACATATGTGA-3'	414
		FR100-B	5'-GGGGGACATTCATATGTACTATTT-3'	
	2ª	FR108-D	5'-CTAATTCTAAAAAATTACAAAATGT-3'	254
		FR164-D3	5'-TTTCTTTCTAAAAATCTTGATAACAACGGAACCTCTTA-3'	

Tabla 4.- PCR anidada para la detección de mutaciones en los codones 51, 59, 108 y 164 del gen *pfdhfr*; pb: Tamaño del producto amplificado en pares de bases

Codon 51		Codon 59		Codon 108		Codon 164	
EcoRI		BsrGI		AluI		PsiI	
Corta (35,78 pb)	S	Corta (43, 65 pb)	S	Corta (46, 210 pb)	S	Corta (42, 214 pb)	S
No cortas (113pb)	M	No corta (113pb)	M	No corta(254 pb)	M	No corta (113pb)	M

Tabla 5.- Digestión enzimática; tamaño del producto del gen *pfdhfr* digerido (enzima corta) o no (enzima no corta) S: codón salvaje; M: codón mutado.

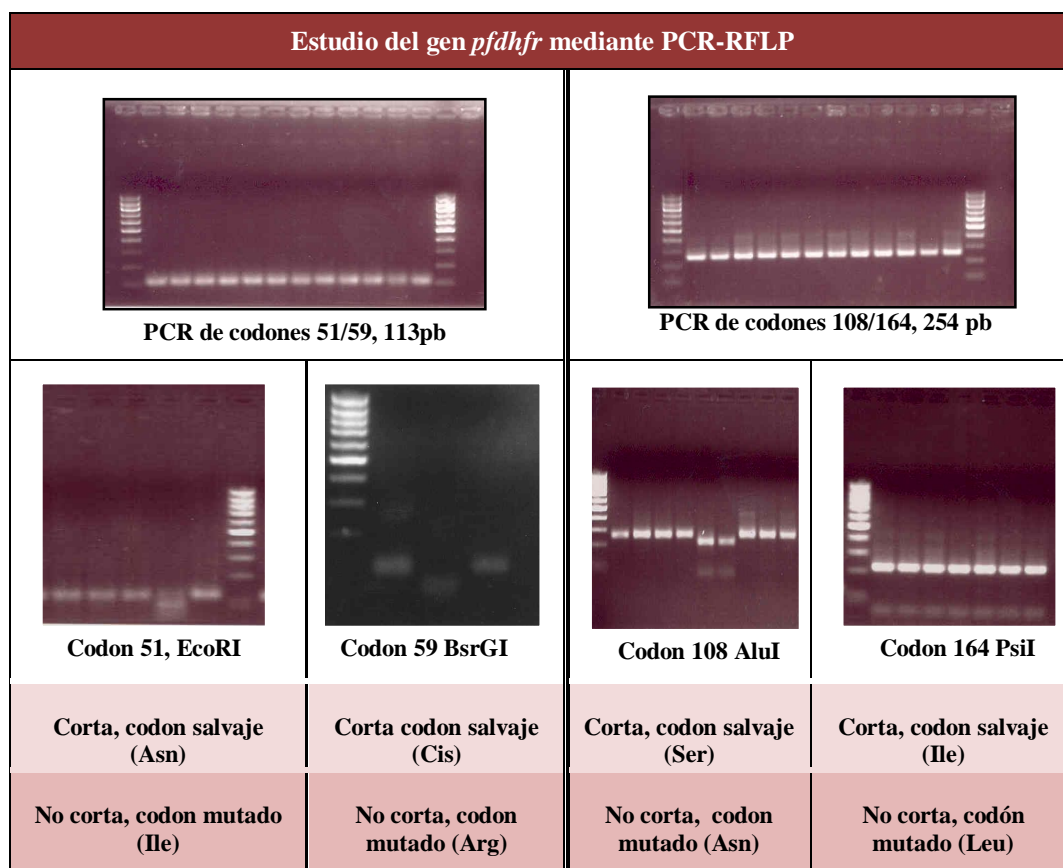


Figura 15.- PCR-RFLP para el estudio del gen *pdfhfr*. En la parte superior, 2ª PCR de los fragmentos que incluyen los codones 51/59 y 108/164. En la parte inferior digestión con enzimas de restricción.

b.- Gen del enzima Dihidropteroato Sintetasa (*pdfhps*): está localizado en el cromosoma 8. Analizamos la presencia o ausencia de mutaciones en los codones 436, 437, 540 y 581, relacionadas con resistencia a sulfadoxina. Se realizan en total 4 reacciones de PCR, dos para amplificar el fragmento en el que se encuentran los codones 436 y 437 y dos para amplificar el fragmento en el que se encuentran los codones 540 y 581. Posteriormente se realizan 4 digestiones con enzimas de restricción.

Para la detección de las mutaciones puntuales en los codones 436 y 437, en una primera reacción se amplifica un fragmento de 249pb; en una segunda reacción se amplifica un fragmento de 148pb (tabla 6). Posteriormente se realizan dos digestiones, con los enzimas MspAII, para el análisis del codón 436, y AvaII, para el análisis del codón 437 (tabla 7). Para la detección de las mutaciones puntuales en los codones 540 y 581, en una primera reacción se amplifica un fragmento de 414pb; en una segunda reacción se amplifica un fragmento de 256pb (tabla 6). Posteriormente se realizan dos digestiones, con los enzimas FokI, para el análisis del codón 540, y MwoI, para el análisis del codón 581 (tabla 7). Los resultados de las electroforesis, tanto de las PCRs como de las digestiones de restricción aparecen en la figura 16.

PCR para el gen <i>pfdhps</i> (cromosoma 8)				
Gen	Reacción	Oligo	Secuencia	*pb
<i>Pfdhps</i> - 436/437	1 ^a	FR400-A	5'GGGGTATTAAATGTTAATTATGATTCT 3'	249
		FR400-B	5'GGGGTCACATTTAACAATTTTATT 3'	
	2 ^a	FR400-D1	5'TGTTCAAAGAATGTTTGAAATGA 3'	148
		FR400-D2	5'CCATTCTTTTTGAAATAATTGTAAT 3'	
<i>Pfdhps</i> - 540/581	1 ^a	FR500-A	5'GGGCCCAAACAAATTCTATAGTG 3'	256
		FR500-B	5'GGCCGGTGGATACTCATCATATA 3'	
	2 ^a	FR500-D1	5'GCGCGCGTTCTAATGCATAAAAGAGG 3'	201
		FR500-D2	5'CCCGGGTAAGAGTTTAATAGATTGATCAGCTTTCTTC 3'	

Tabla 6.- PCR anidada para la detección de mutaciones en los codones 436, 437, 540, 581 del gen *pfdhps*. pb: pares de bases.

Codon 436		Codon 437		Codon 540		Codon 581	
MspAII		AvaII		FokI,		MwoI	
Corta (69, 79 pb)	M	Corta (69, 79 pb)	M	Corta (56,145 pb))	M	Corta (36, 154 pb)	S
No cortas (148 pb)	S	No corta (148 pb)	S	No corta (201 pb)	S	No corta (201 pb)	M

Tabla 7.- Digestión enzimática; tamaño del producto del gen *pfdhps* digerido (enzima corta) o no (enzima no corta) **S**: codón salvaje; **M**: codón mutado.

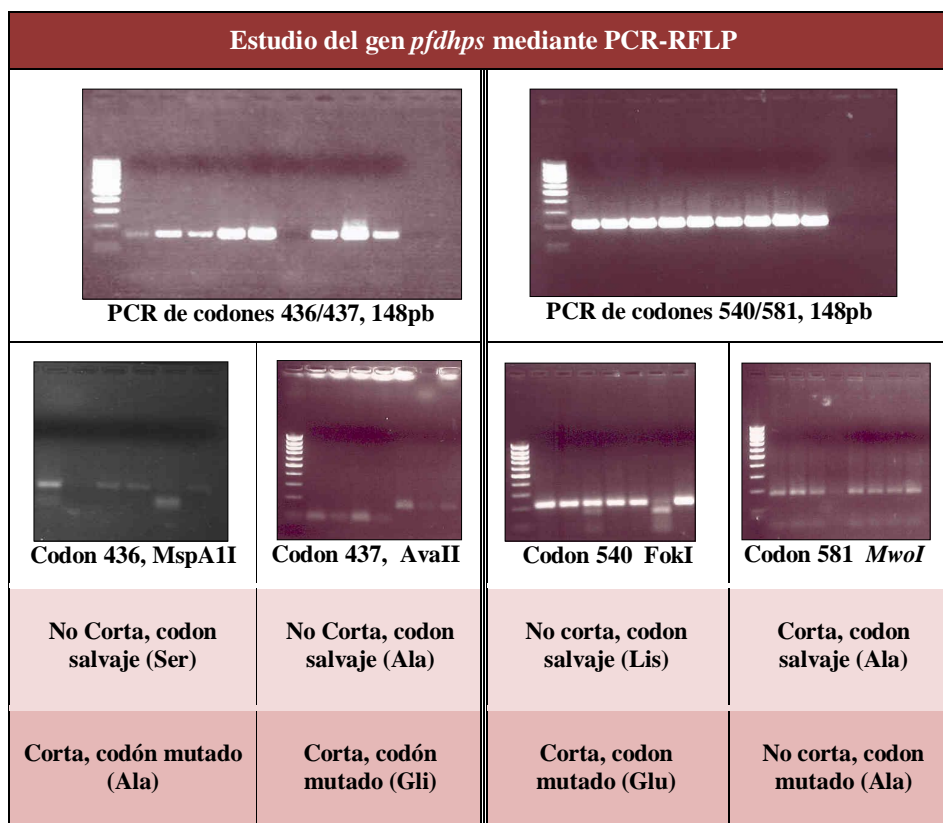


Figura 16.- PCR-RFLP para el estudio del gen *pf dhps*. En la parte superior, 2ª PCR de los fragmentos que incluyen los codones 436/437 y 540/581. En la parte inferior digestión con enzimas de restricción.

c.- Gen del Transportador de Cloroquina Asociado a resistencia (*pf crt*): está localizado en el cromosoma 7; analizamos las mutaciones en el codón 76, relacionado con resistencia a cloroquina y otros antimaláricos. Se realizan en total 2 reacciones de PCR. En una primera reacción se amplifica un fragmento de 206pb; en una segunda reacción se amplifica un fragmento de 145pb (tabla 8). Posteriormente se realiza una digestión con el enzima ApoI (tabla 9).

PCR para el gen <i>pf crt</i> (cromosoma 7)				
Gen	Reacción	Oligo	Secuencia	pb*
<i>pf dhfr-76</i>	1ª	76-A	5'-GCGCGCGCATGGCTCACGTTTAGGTGGAG-3'	206
		76-B	5'-GGGCCCCGGCGGATGTTACAAACTATAGTTACC-3'	
	2ª	76-D1	5'-TGTGCTCATGTGTTAAACTT-3'	145
		76-D2	5'-CAAACTATAGTTACCAATTTTG-3'	

Tabla 8.- PCR anidada para la detección de mutaciones en el codon 76 gen *pf crt*. Pb: pares de bases.

CODON 76	
ApoI	
Corta (99,46 pb)	S
No cortas (145 pb)	M

Tabla 9.- digestión enzimática; tamaño del producto digerido (**S**: codón salvaje) o no digerido (**M**: codón mutado).

d.- Gen de la Proteína relacionada con Multiresistencia (*pfmdr1*): está localizado en el cromosoma 5. Analizamos la presencia o ausencia de mutaciones en los codones 86 y 1246, asociadas a multirresistencia. Se realizan en total 4 reacciones de PCR, dos para amplificar el fragmento en el que se encuentran el codón 86 y dos para amplificar el fragmento en el que se encuentran el codón 1246. Posteriormente se realizan 2 digestiones con enzimas de restricción.

Para la detección de la mutación puntual en el codón 86, en una primera reacción se amplifica un fragmento de 450pb; en una segunda reacción se amplifica un fragmento de 291pb (tabla 10). Para la detección de la mutación puntual en el codón 1246, en una primera reacción se amplifica un fragmento de 295pb; en una segunda reacción se amplifica un fragmento de 203pb (tabla 10). Posteriormente se realizan dos digestiones, con los enzimas AflIII, para el análisis del codón 86, y BglII, para el análisis del codón 1246 (tabla 11). Los resultados de las electroforesis, tanto de las PCRs como de las digestiones de restricción aparecen en la figura 17.

PCR para el gen <i>pfmdr1</i> (cromosoma 5)				
Gen	Reacción	Oligo	Secuencia	pb
<i>pfmdr1</i> -86	1ª	MDR-A	5'-GCGCGCGTTGACAAAAAGAGTACCGCTG-3'	450
		MDR-B	5'-GGGCCCTCGTACCAATTCCTGAACTCAC-3'	
	2ª	MDR-D1	5'-TTTACCGTTTAAATGTTTACCTGC3'	291
		MDR-D2	5'-CCATCTTGATAAAAAACACTTCTT-3'	
<i>pfmdr1</i> -1246	1ª	1246-A	5'-GGGGGATGACAAATTTCAAGATTA-3'	295
		1246-B	5'-GGGGGACTAACACGTTTAACATCTT-3'	
	2ª	1246-D1	5'-AATGTAAATGAATTTTCAAACC-3'	203
		1246-D2	5'-CATCTTCTCTTCCAAATTTGATA-3'	

Tabla 10.- PCR anidada para la detección de mutaciones en los codones 86 y 1246 gen *pfmdr1*. Pb: pares de bases.

CODON 86		CODON 1246	
AflIII		BglII	
Corta (126, 165 pb)	M	Corta (113, 90 pb)	S
No cortas (295 pb)	S	No corta (203 pb)	M

Tabla 11.- Digestión enzimática; tamaño del producto del gen *pfmdr1* digerido (enzima corta) o no (enzima no corta). **S:** codón salvaje; **M:** codón mutado.

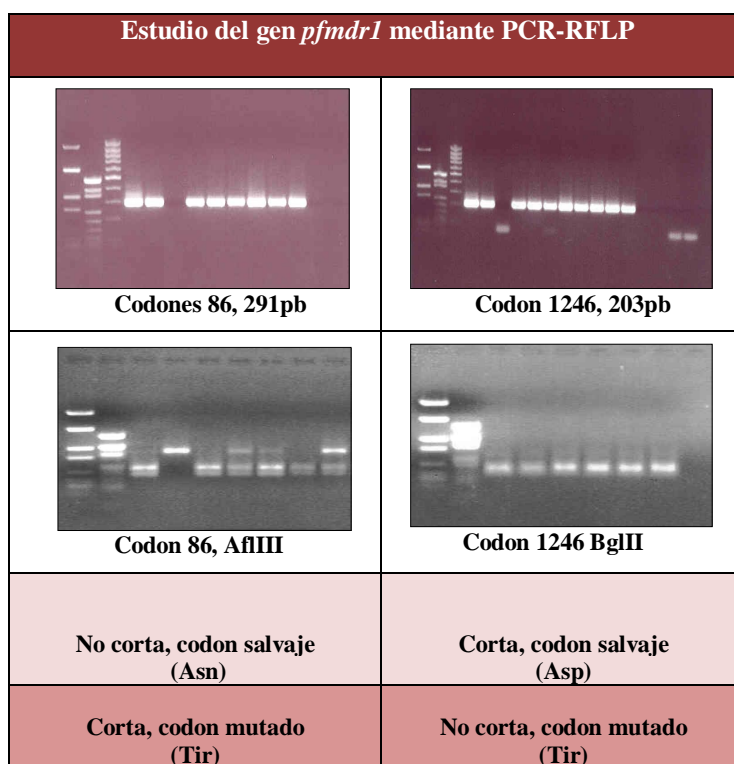


Figura 17.- PCR-RFLP para el estudio del gen *pfmdr1*. En la parte superior, 2ª PCR de los fragmentos que incluyen los codones 86 y 1246. En la parte inferior digestión con enzimas de restricción.

3.4 PCR anidada para la caracterización genética de las poblaciones de *P. falciparum* y estudio de multiplicidad de la infección

Para la caracterización genética de poblaciones de *P. falciparum* presentes en un aislado se utilizó la técnica de PCR anidada descrita por Robert y col. (1996), con la que se determina la variabilidad de dos genes, *pfmsp1* y *pfmsp2*, que codifican dos proteínas de superficie del merozoíto, MSP1 y MSP2. Para la realización del capítulo III se analizó la variabilidad del gen *pfmsp1*.

El gen *pfmsp1* se localiza en el cromosoma 9. La PCR anidada está diseñada para amplificar el bloque 2 (el gen está constituido por 17 bloques, ver introducción). Se amplificó el bloque 2 del gen *pfmsp1*, siendo necesarios para ello ocho pares de oligonucleótidos. En la primera reacción de PCR se amplificaron los bloques 1 a 3, mediante los oligonucleótidos MSP-1A/ MSP-1B. Se utilizan 2µl del ADN molde para la realización de la primera PCR, en un volumen final de reacción de 25µl.

Una alícuota de 1µl del producto amplificado en la primera reacción se somete a tres reacciones diferentes de PCR, cada una específica para cada una de las tres familias alélicas descritas, K1, MAD20 y RO33. Estas familias alélicas difieren en la secuencia del bloque 2 y dentro cada una de ellas existe un número variable de copias de secuencias repetidas, lo que origina polimorfismos de tamaño. La familia K1 fue detectada con el par de oligonucleótidos MSP1-K1A/ MSP1-K1B, la familia MAD20 con el par de oligonucleótidos MSP1-M1/ MSP1-M2 y la familia RO33 con el par de oligonucleótidos MSP1-R1/ MSP1-R2 (tabla 12), el volumen final de reacción de PCR es de 25µl. Una vez finalizada la PCR se realiza una electroforesis en agarosa al 2,5% teñido con bromuro de etidio (figura 18).

Estudio gen <i>pfmsp1</i>				
Familia	Reacción	Oligos	Secuencia	*pb
	1ª	M1-1A M1-1B	5'-AAGCTTTAGAAGATGCAGTATTGAC-3' 5'- ATTCATTAATTTCTTCATATCATC-3'	
K1	2ª-	M1-K1A M1-K1B	5'-GAAATTACTACAAAAGGTGCAAGTG-3' 5'-AGATGAAGTATTTGAACGAGGTAAAGTG-3'	110-900
Mad20	2ª-	M1-M1 M1-M2	5'-GAACAAGTCGAACAGCTGTTA-3' 5'-TGAATTATCTGAAGGATTTGTACGTCTTGA-3'	100-700
RO33	2ª-	M1-R1 M1-R2	5'-GCAAATACTCAAGTTGTTGCAAAGC-3' 5'-AGGATTTGCAGCACCTGGAGATGT-3'	150

Tabla 12.- PCR anidada para la determinación de familias alélicas del gen *pfmsp1*. * Rango del tamaño de los fragmentos amplificados en las muestras del estudio en pares de bases.

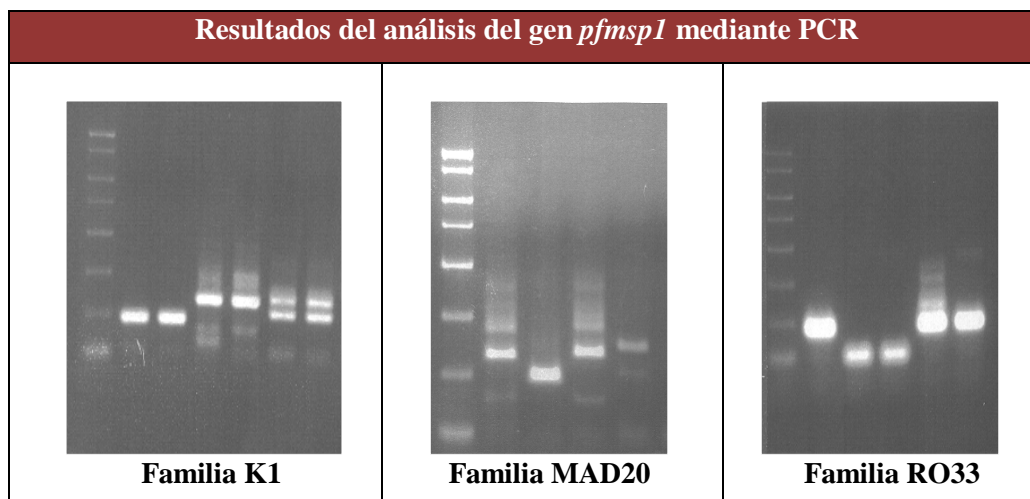


Figura 18.- Resultado en agarosa de las amplificaciones de las tres familias del gen *pfmsp1*

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el paquete informático SPSS (“Statistical Software Package”), versión 15.0. La asociación entre variables categóricas y/o cualitativas se analizó mediante la prueba de chi cuadrado (χ^2) o el test exacto de Fisher, cuando fue apropiado. La asociación entre variables categóricas y variables cuantitativas se estudió mediante la U de Mann-Whitney o el test de Kruskal-Wallis, cuando fue conveniente. Las variables que mostraron diferencia en el análisis univariante ($p < 0,2$) se analizaron mediante regresión logística múltiple (análisis multivariante). La estrategia utilizada fue la de “backward stepwise”

El nivel de significación estadística se estableció en $p \leq 0,05$.

EVOLUCIÓN DE MARCADORES MOLECULARES DE RESISTENCIA A ANTIMALÁRICOS EN AISLADOS AFRICANOS DE *Plasmodium falciparum* DURANTE 8 AÑOS: IMPACTO DE LA INTRODUCCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS COMBINADOS CON ARTEMISININAS

1. Introducción

El tratamiento de malaria es uno de los grandes pilares para el control de la enfermedad causada por *P. falciparum* en zonas endémicas (Meek y col., 2011). Uno de los grandes problemas que se detectan para conseguir un adecuado control de la enfermedad es la resistencia a los antimaláricos (Steketee y col., 2011). Se han descrito en varios genes de *P. falciparum* mutaciones puntuales que se asocian con resistencia a los tratamientos. Estas mutaciones se producen de forma espontánea en el parásito, aunque la presión farmacológica es uno de los principales determinantes de su dispersión (Malisa y col., 2010). Desde la segunda mitad del siglo XX hasta hoy el tratamiento de la malaria ha ido cambiando, debido a la pérdida de eficacia de los fármacos empleados, asociado al desarrollo de resistencias. En África el uso de cloroquina (CQ) comenzó alrededor de 1950. Los primeros casos de resistencia se detectaron en el este del continente en 1978. Desde aquí la resistencia se propagó hacia el centro y el sur y más tarde hacia el oeste. Actualmente la resistencia aparece en todas las regiones en las que *P. falciparum* está presente (Mita y col., 2009). La cloroquina se acumula en la vacuola digestiva del parásito, donde es transportada por proteínas de membrana, que incluyen el “*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter” (PfCRT), codificado por el gen *pfcr*t, y la P-glicoproteína homóloga-1 (Pgh1), codificada por el gen *pfmdr*1. El principal determinante de la resistencia a cloroquina es la mutación K76T en el gen *pfcr*t, que produce resistencia *in vivo* e *in vitro* (Lehane y col., 2011). Además las mutaciones N86Y y D1246Y en el gen *pfmdr*1, cuando aparecen con la mutación en el gen *pfcr*t, reducen la sensibilidad a cloroquina (Sá y col., 2009).

El uso de sulfadoxina-pirimetamina (SP) comenzó en África en los inicios de los años 1980 y se adoptó como primera línea de tratamiento para la malaria no complicada en numerosos países del África subsahariana. La resistencia a la combinación apareció rápidamente, tras 2 años de su uso extendido (Mita y col., 2009). En la última década los altos niveles de resistencia alcanzados en todo el continente han llevado a un cambio en las políticas de tratamiento. La combinación SP es recomendada actualmente por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la terapia preventiva intermitente, (“Intermittent Preventive Therapy”, IPT), en mujeres embarazadas (IPTp) y niños (de 0 a 5 años) (IPTi/IPTc) para reducir los episodios de malaria y la anemia (Osungbade y col., 2011; Ahorlu y col., 2011).

Distintas mutaciones en genes que codifican enzimas esenciales en la síntesis de folatos en el parásito han sido relacionadas con resistencia a SP: mutaciones en el gen *dhfr*, que codifica la dihidrofolato reductasa (DHFR), diana de la pirimetamina, y mutaciones en el gen *dhps* que codifica la dihidropteroatosintetasa (DHPS), diana de la sulfadoxina. La pérdida de la eficacia de uno de los dos componentes lleva a una reducción en la eficacia de la combinación (Salgueiro y col., 2010). La resistencia a la pirimetamina está relacionada con las mutaciones puntuales (“Single Nucleotide Polymorphisms”, SNPs) A16V, C50R N51I, C59R, S108N/T, I164L del gen *pf dhfr*; La mutación C50R, habitualmente descrita en Sudamérica, ha sido detectada recientemente en África. (McCollum y col., 2006; McCollum y col, 2007). La mutación I164L es raramente descrita en África y su relación con la resistencia en este continente es dudosa (Ahmed y col., 2006; Hyde y col., 2008). Las mutaciones N51I, C59R, S108N son muy comunes en África. En el gen *pf dhps* se han identificado 5 mutaciones puntuales asociadas con la resistencia a sulfadoxina en *P. falciparum*: S436A A437G, K540E, A581G, A613S/T. Un incremento en el número de mutaciones en los dos genes se corresponde con un aumento de la resistencia clínica. En África, la triple mutación *pf dhfr* (51I-59R-108N) asociada a la doble mutación *pf dhps* (437G-540E) es un marcador molecular predictivo de fracaso terapéutico (Vinayak y col., 2010).

Actualmente, en los 46 países africanos en los que existe transmisión de *P. falciparum* se emplean tratamientos basados en combinaciones con artemisininas (“Artemisinin-based Combination Therapies”, ACTs) como primera línea, en la malaria no complicada, siendo Artemeter-Lumefantrina (AL) y Artesunato-Amodiaquina (AS+AQ) las combinaciones más usadas (Lin y col., 2010; WHO African region 2011). Las mutaciones en los genes *pf crt* y *pf mdr1* también afectan a la efectividad de la amodiaquina, estructuralmente relacionada con la cloroquina, aunque estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que la resistencia cruzada entre las dos moléculas es incompleta (Humphreys y col., 2007). Los alelos salvajes *pf mdr1*-N86 y *pf mdr1*-D1246 están relacionados con una disminución de la respuesta *in vitro* a mefloquina, halofantrina, quinina (Q), lumefantrina (L) y artemisinina (AS) (Somé y col., 2010). Tras la introducción de AL se ha detectado una asociación *in vivo* con reinfecciones por cepas con los alelos salvajes *pf mdr1*-D1246, *pf mdr1*-N86 (Dokomajilar y col., 2006) y *pf crt*,-K76 (Sisowath y col., 2009).

El Hospital Carlos III de Madrid es un centro de referencia de enfermedades tropicales. En los Servicios de Medicina Tropical y Pediatría se atiende a inmigrantes y viajeros. Analizamos SNPs en *P. falciparum* relacionados con resistencia en pacientes procedentes de distintos países africanos. Las muestras fueron recogidas en un periodo de 8 años, durante la fase de transición de una alta cobertura con SP al tratamiento con ACTs, con el objetivo de establecer la prevalencia de cepas resistentes a antimaláricos durante dicho periodo y medir el impacto de la presión farmacológica.

2. Materiales y Métodos

Muestras biológicas

Se tomaron muestras de sangre de 200 pacientes con infección por *P. falciparum* llegados a España de 18 países africanos. Tras el diagnóstico microscópico, la confirmación de la identificación a nivel de especie se realizó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN fue extraído a partir de 200 µl de sangre total con EDTA con el kit comercial QIAamp DNA Blood Minikits® (QIAGEN, Hilden, Alemania). Las 200 muestras seleccionadas fueron clasificadas en tres regiones diferentes: África Oriental (Etiopía, República de Tanzania, Uganda y Mozambique), África Central (Guinea Ecuatorial, Gabón, Camerún, República Democrática del Congo, República Central Africana y Angola) y África Occidental (Sierra Leona, Burkina Faso, Costa de Marfil, Senegal, Mali, Guinea Bissau, Nigeria y Ghana). A su vez se dividieron en dos grupos, el primero formado por las muestras recogidas entre junio de 2002 y junio de 2006 y un segundo grupo que incluyó las muestras recogidas entre noviembre de 2008 y agosto de 2010 (figura 1.1).

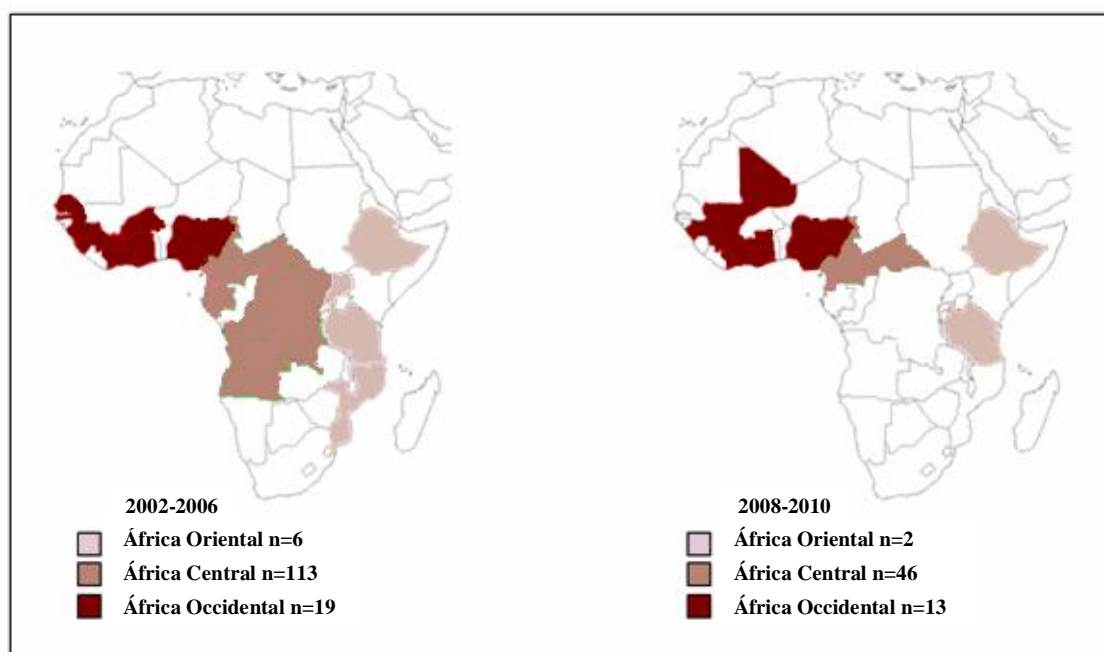


Figura 1.1.- Distribución de los pacientes por regiones africanas de procedencia

Análisis moleculares

Para el diagnóstico de especie de malaria se utilizó una PCR múltiple (Padley y col., 2003). Para el análisis de la presencia o ausencia de mutaciones de resistencia se utilizó una PCR anidada seguida de un análisis de restricción de fragmentos de longitud polimórfica (RFLP) (http://medschool.umaryland.edu/cvd/2002_pcr_asra.htm). Se analizaron los codones 51, 59, 108 y 164 del gen *pf dhfr*, codones 436, 437, 540 y 581 del gen *pf dhps*, codones 86 y 1246 del gen *pf mdr1*, y el codon 76 del gen *pf crt*. Siguiendo las pautas de otros autores, las poblaciones mixtas fueron consideradas como mutantes (Dippmann y col., 2008).

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete estadístico SPSS (“Statistical Software Package”), versión 15.0. La prevalencia de mutaciones en los dos grupos se comparó con el test de chi cuadrado (χ^2) o el test exacto de Fisher, cuando fue apropiado. El nivel de significación estadística se estableció con un valor de $p \leq 0,05$.

3. Resultados

La PCR-RFLP para los genes *pf dhfr*, *pf dhps*, *pf mdr1* y *pf crt* fue efectiva en el 95%-100% de las reacciones.

pf dhfr-pf dhps: en el gen *pf dhfr* la prevalencia de las mutaciones 51I, 59R y 108N se mantuvo superior al 90% y el alelo salvaje I164 se encontró en todas las muestras a lo largo de los 8 años del periodo de estudio. La prevalencia de mutaciones en el gen *pf dhps* aumentó, hasta el 83,6% en el caso de la mutación 437G y hasta el 10% en el de la mutación 581G ($p=0,024$), en el segundo grupo de muestras (2008-2010). En contraste con esto, la mutación 436A desapareció ($p=0,004$) y la mutación 540E descendió desde un 24,6% a un 16,7% al final del estudio. El análisis de las tres regiones, África Oriental, Central y Occidental mostró una tendencia similar en todas las áreas, aunque estos cambios fueron sólo significativos en África Central, probablemente por disponer de un mayor número de muestras procedentes de esta zona (tabla1.1).

África Oriental (n=8)						África Central (n=159)					África Occidental (n=32)				
2002-2005 (n=6)		2008-2010 (n=2)		p		2002-2005 (n=113)		2008-2010 (n=46)		p	2002-2005 (n=19)		2008-2010 (n=13)		p
W	M	W	M			W	M	W	M		W	M	W	M	
<i>pfdhfr-51</i>	0	100	0	100	1	2,7	97,3	6,5	93,5	0,3	15,8	84,2	15,4	84,6	1
<i>pfdhfr-59</i>	0	100	0	100	1	2,7	97,3	6,5	93,5	0,3	21,1	78,9	15,4	84,6	1
<i>pfdhfr-108</i>	0	100	0	100	1	0	100	0	100	1	10,5	89,5	7,7	92,3	1
<i>pfdhfr-164</i>	100	0	100	0	1	100	0	100	0	1	100	0	100	0	1
<i>pfdhps-436</i>	83,3	16,7	100	0	1	85,7	14,3	100	0	0,004	100	0	100	0	1
<i>pfdhps-437</i>	33,3	66,7	0	100	1	27,7	72,3	17,4	82,6	0,17	31,6	68,4	15,4	84,6	0,4
<i>pfdhps-540</i>	50	50	50	50	1	75	25	84,8	15,2	0,17	89,5	10,5	83,3	16,7	0,6
<i>pfdhps-581</i>	100	0	100	0	1	97,3	2,7	89,1	10,9	0,004	100	0	91,7	8,3	0,3
<i>pfmdr1-86</i>	60	40	100	0	1	49,5	50,5	53,3	46,7	0,66	42,1	57,9	72,7	27,3	0,1
<i>pfmdr1-1246</i>	60	40	100	0	1	67,9	32,1	97,8	2,2	0,0001	47,4	52,6	69,2	30,8	0,2
<i>pfprt-76</i>	16,7	83,3	0	100	1	4,5	95,5	3,8	96,2	0,6	0	100	8,3	91,7	0,3

Tabla 1.1.- Prevalencia (%) de alelos salvajes (W) y alelos mutados (M).

La frecuencia del haplotipo *pfdhfr* con más de una mutación aumentó en todo el continente. El más frecuente fue el de la triple mutación en *pfdhfr* (51I-59R-108N). Este haplotipo fue menor en África Occidental al inicio del estudio, pero mostró un aumento del 61,1% al 83,3% al final del seguimiento, con la desaparición del haplotipo de *pfdhfr* con la doble mutación 51I-59R (tabla 1.2).

África: <i>pfdhfr</i> (I: 2002-2006, n= 130 II: 2008-2010, n=60)										
A	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Salvaje	0	1,7	Simple 108N	2,3 3,3	Doble 51I- 108N 59R-108N 51I- 59R	1,5 0 3,1 3,3 1,5 0			Triple 51I-59R-108N	90,8 81,3
B	Salvaje		Simple		Doble		Triple			
África Oriental	2002-2006 (n=5)		0		0		0		100	
	2008-2010 (n=2)		0		0		0		100	
África Central	2002-2006 (n=106)		0		0,9		3,8		95,3	
	2008-2010 (n=46)		0		2,2		8,6		89,1	
África Occidental	2002-2006 (n=18)		0		11,1		27,8		61,1	
	2008-2010 (n=12)		8,3		8,3		0		83,3	

Tabla 1.2.- Distribución de los genotipos *pfdhfr* (%). A- Distribución global; B- Prevalencia en las tres regiones.

En el gen *pfdhps* el haplotipo más frecuente fue el 437G, que aumentó desde 46,7% a 60%, seguido de la mutación doble 437G-540E, a pesar del descenso en la prevalencia de la mutación 540E. La doble mutación *pfdhps*-437G-581G también aumentó ($p=0,031$) (tabla 1.3).

El análisis por regiones muestra un mínimo aumento de las mutaciones triples y un descenso en las dobles en África Central, pero un aumento de la mutación *pfdhps* doble del 10,5% al 25% en África Occidental. Estos cambios no son significativos, excepto en el caso de la doble mutación 437G-581G en África Central, donde pasó de ser el 3,6% en el primer periodo al 33,3%, del total de las mutaciones *pfdhps* dobles ($p=0,03$).

África: <i>pf dhps</i> (I: 2002-2006, n=137 II: 2008-2010, n=60)										
A	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Salvaje	19	15	Simple		Doble		Triple			
			436A	4,4	437G-540E	16,8	436A-437G-540E	1,5	0	
			437G	46,7	437G-581G	0,7	437G-540E-581G	1,5	0,6	
			540E	3,6	436A-437G	4,4				
			581G	0,7	436A-540E	1,5				
B										
			Salvaje		Simple		Doble		Triple	
África Oriental	2002-2006 (n=6)		33,3		16,7		33,3		16,7	
	2008-2010 (n=2)		0		50		50		0	
África Central	2002-2006 (n=111)		16,2		56,8		25,2		1,8	
	2008-2010 (n=46)		15,2		63		19,6		2,2	
África Occidental	2002-2006 (n=19)		31,6		57,9		10,5		0	
	2008-2010 (n=12)		16,7		58,3		25		0	

Tabla 1.3.- Distribución de los genotipos *pf dhps* (%). A- Distribución global; B- Prevalencia en las tres regiones.

La aparición conjunta de mutaciones en los dos genes *pf dhfr* y *pf dhps* se observó en el 76% de los pacientes (n=152). Se documentaron 14 haplotipos (figura 1.2). Al final del estudio los más prevalentes fueron el de la cuádruple mutación (51I-59R-108N-437G), que se incrementó de un 53,4% en 2002-2006 a un 63,3%, en 2008-2010; seguido de la quintuple (51I-59R-108N-437G-540E), a pesar de un descenso de 18,4% en 2002-2006 a 16,3% en 2008-2010, como resultado del descenso de la prevalencia de la mutación 540E; y la quintuple (51I-59R-108N-437G-581G), que aumentó de 1% en 2002-2006 a un 8,2 en 2008-2010% (p=0,03). El análisis por regiones mostró un ligero descenso en las mutaciones cuádruple y quintuple en África Central, a expensas de un aumento de las doble, triple y séxtuple y un aumento de la cuádruple y la quintuple en África Occidental, motivado por de la desaparición de los haplotipos doble y triple (figura 1.3).

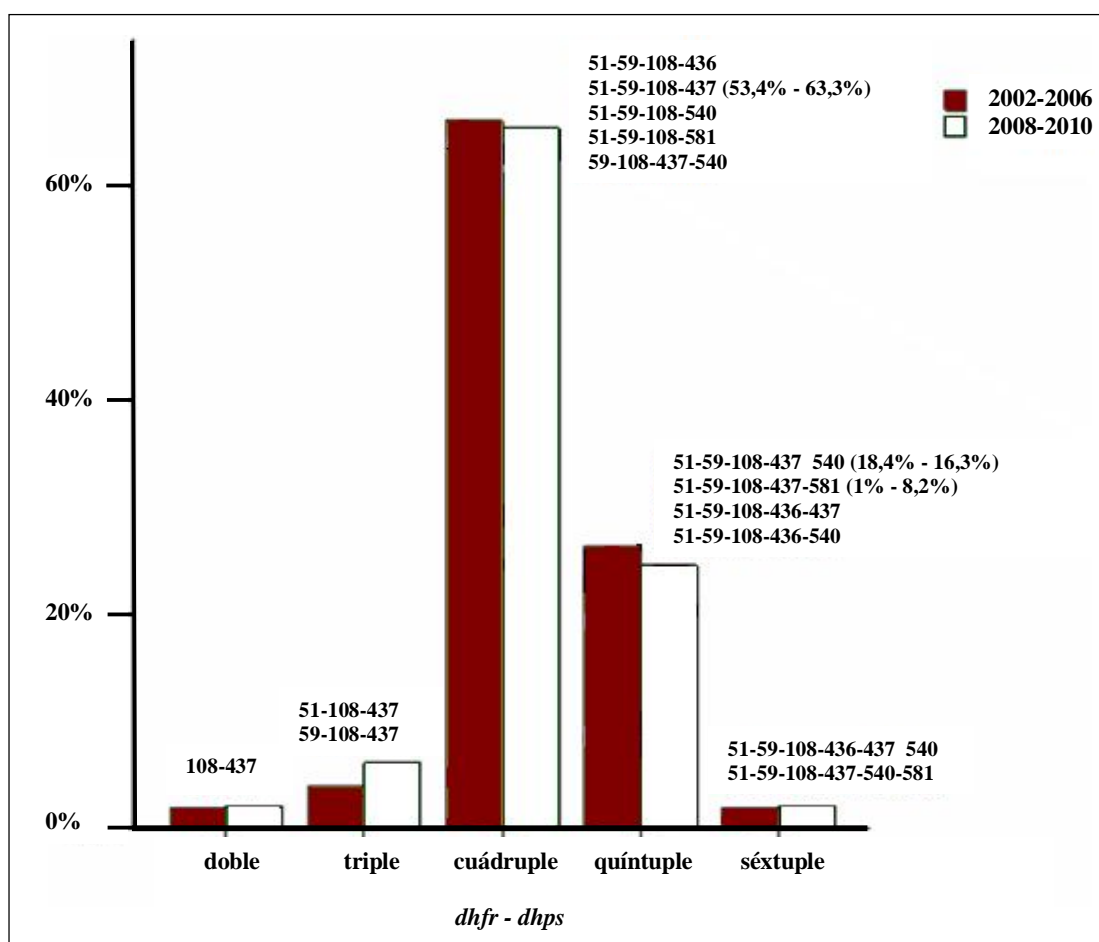


Figura 1.2.- Distribución de los haplotipos *dhfr-dhps* 2002-2010.

pfcr1: el alelo mutado 76T del gen *pfcr1* se mantuvo por encima del 95% en todas las regiones a lo largo de todo el estudio (tabla 1.1).

pfmdr1: la prevalencia de los alelos salvajes N86 y D1246 del gen *pfmdr1* aumentó a lo largo de los 8 años; en el caso de este último su incremento fue estadísticamente significativo en África Central ($p < 0,001$).

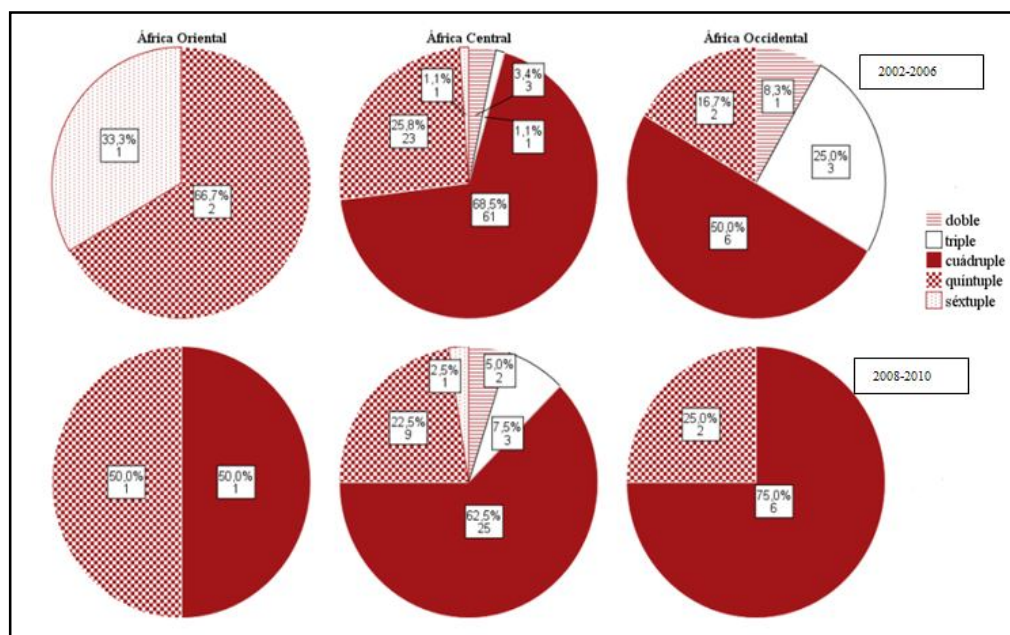


Figura 1.3.- Distribución de los haplotipos *pfdhfr-pfdhps* por regiones y años.

4. Discusión

El tratamiento de la malaria es uno de los pilares fundamentales de los programas de control de la enfermedad y la resistencia del parásito a los antimaláricos uno de sus mayores problemas. Las estrategias actuales se basan en las ACTs, encaminadas a reducir la pérdida de eficacia de los tratamientos con CQ y SP debido a la emergencia y dispersión de resistencias, resultante, entre otros factores, de la presión farmacológica y el movimiento de poblaciones (Naidoo y col., 2010).

La vigilancia tras el cambio de las políticas de tratamiento es esencial para evaluar el impacto de la introducción del nuevo tratamiento, así como el efecto que tiene en la población la retirada del tratamiento que se ha sustituido, en este caso SP. La influencia del intenso uso de un fármaco en la aparición y dispersión de las resistencias, es decisiva. Tras la sustitución de SP en la población, se debería observar que la prevalencia de alelos relacionados con la resistencia debe disminuir cuando cesa la presión farmacológica (Picot y col., 2009).

En el caso de la SP en África, no parece existir una reducción en la prevalencia de los marcadores de resistencia tras la introducción de ACTs. Incluso en algunas regiones se ha observado un aumento, lo que se ha atribuido al uso extendido de otras moléculas que presentan resistencia cruzada con ella, como el cotrimoxazol (Kapito-Tembo y col., 2011), y al hecho de que la combinación siga circulando ampliamente fuera del sector oficial (WHO 2010; Gasasira y col., 2010; Raman y col., 2010).

En nuestro estudio, aunque se incluyeron pacientes de 18 países africanos la distribución fue desigual, proviniendo la mayor parte de África Central (79,9%), en menor proporción de África Occidental (16,1%) y siendo escasamente representativa la región oriental del continente (4%). Esto conlleva la limitación de que ciertas tendencias observadas en los sujetos de África Occidental y Oriental no quedan comprobadas estadísticamente por el escaso número de pacientes. Aún así, son pocos los estudios que han englobado en su conjunto todo el continente africano para una valoración de la evolución de los marcadores de resistencia en un tiempo muy prolongado (8 años) que ha valorado el impacto de las nuevas terapias basadas en ACTs.

Las muestras de los pacientes de África Central y Occidental presentan diferentes tendencias, la prevalencia de mutaciones en África Central parece estabilizarse o disminuir mientras que en África Occidental aumenta.

El estudio de las muestras indica que, a lo largo de 8 años, el triple mutante *pf dhfr* (51I-59R-108N) se consolida en África Central y aumenta en África Occidental. En cuanto a las mutaciones implicadas en la resistencia a sulfadoxina la mutación simple *pf dhps*-437G se mantiene como la más prevalente. Sin embargo, es de destacar un descenso en la mutación 540E en África central y, especialmente, la aparición de la mutación 581G, (2 casos en Camerún, 1 en Gabón, y 5 en Guinea Ecuatorial, países en los que esta mutación no ha sido descrita previamente). La desaparición de la mutación 436A junto con el descenso en la mutación 540E conlleva un descenso en la frecuencia de mutaciones dobles en esta región. En África Occidental la tendencia es distinta, ya que la mutación 540E aumenta su prevalencia; además detectamos un caso de alelo mutado en 581G, en Mali, donde esta mutación ha sido ya descrita (Gesase y col., 2009). En África Central el descenso de algunos marcadores de resistencia relacionados con la sulfadoxina, como las mutaciones 540E y 436A, puede ser la consecuencia de un menor uso de la combinación y sugiere que estas mutaciones no están establecidas en esta región. Sin embargo, el mantenimiento de la cuádruple mutación *dhfr-dhps*, se produce a expensas de un aumento de las mutaciones 437G y 581G. Se ha observado que, en áreas donde la triple mutación de *pf dhfr* con la doble de *pf dhps* están bien establecidas, la aparición de la mutación 581G puede poner en peligro las terapias preventivas intermitentes con SP (Laufer y col., 2010; Harrington y col., 2009; Van Eijk y col., 2011). En África Occidental se observa una tendencia al aumento en las mutaciones en el gen *pf dhps* (excepto en el caso del alelo 436A, que desaparece al final del estudio), con el consiguiente incremento de los cuádruple y quíntuple mutantes *dhfr-dhps* (figura 1.3).

Estos diferentes patrones en las dos regiones sugieren, por una parte, que el descenso en el uso de SP parece haber sido más temprano o más eficaz en África Central que en África Occidental, y, por otra, que algunas mutaciones relacionadas con sulfadoxina no están establecidas en África Central, como parece ocurrir en regiones de África Oriental, donde la proporción de la quíntuple mutación (*dhfr*-51I-59R-108N, *dhps*-437G-540E) es muy elevada a pesar del cambio a ACTs (Raman y col.,

2010). A todos los efectos, para verificar si se están produciendo cambios significativos en la prevalencia de las mutaciones relacionados con una disminución en el uso de SP y estar alerta ante la aparición de mutaciones poco descritas en estas regiones hasta la fecha, (581G) sería necesaria la vigilancia continuada, para evaluar su impacto en la IPT (Bertin y col., 2011; Kuile y col., 2007). Además de su papel de marcador de alta resistencia a SP ha sido demostrada una selección de esta mutación en mujeres que reciben IPT (Harrington y col., 2009).

En cuanto a marcadores moleculares de resistencia relacionados con los antimaláricos usados actualmente en África (genes *pfprt* y *pfmdr1*), se ha observado un descenso en la prevalencia de las mutaciones *pfprt*-76T y *pfmdr1*-86Y en respuesta a la disminución en el uso de CQ en algunas regiones (Frosch y col., 2011). Por otro lado los alelos salvajes *pfmdr*-N86 y *pfprt*-K76 se han asociado con menor sensibilidad a dihidroartemisinina *in vitro* (Humphreys y col., 2007; Onyamboko y col., 2011). Además estudios realizados tras la introducción de las ACTs han demostrado que tras el tratamiento con AL existe una selección de parásitos con alelo salvaje *pfmdr1*-N86, *pfmdr1*-D1246 (Dokomajilar y col., 2006) y *pfprt*-K76 (Sisowath y col., 2009). El primer marcador se ha asociado con un descenso significativo de la sensibilidad *in vitro* a L, y a un aumento *in vivo* de las reinfecciones tras el tratamiento con AL, efecto que aumenta en presencia del alelo salvaje *pfprt*-K76, lo que hace aconsejar el uso de L en áreas donde las mutaciones de resistencia a la cloroquina permanecen altas (WHO 2010).

En todas las regiones estudiadas la prevalencia del alelo mutado *pfprt*-76T se sitúa por encima del 95% al final del estudio, sin embargo, la prevalencia de los alelos salvajes del gen *pfmdr1* van aumentando, de manera que *pfmdr1*-N86 se sitúa por encima del 50% en África Central y por encima del 70% en África Occidental y *pfmdr1*-D1246 es superior al 90% en África Central y al 70% en África Occidental. A la vista de estos resultados, y para determinar si este aumento en los alelos salvajes es el resultado de la presión selectiva de los tratamientos con ACTs, es recomendable un seguimiento, por sus posibles consecuencias, ya que puede significar el primer escalón para la resistencia a AL.

En España como en otros países libres de malaria, determinar los alelos de resistencia de los parásitos que infectan a inmigrantes o viajeros, tiene poca relevancia en la elección de un tratamiento eficaz. Hay que destacar sin embargo que dentro del grupo de pacientes incluidos en el estudio, se produjo un caso de fracaso terapéutico en un niño de 14 años procedente de Guinea Ecuatorial. El paciente ingresó en julio de 2005 y fue tratado con halofantrina; en septiembre de ese mismo año reingresó por un cuadro de paludismo y gota gruesa positiva, sin haber regresado a zona endémica de malaria. En el análisis de marcadores se detectaron alelos salvajes en *pfmdr1*-N86Y y *pfmdr1*-D1246Y.

El conocer las resistencias de un área determinada es útil para administrar una profilaxis correcta a los viajeros. Además se tendría que hacer una vigilancia de los pacientes tratados en los hospitales, para comprobar si aparecen fracasos terapéuticos, y ante algún caso se debería valorar hacer un estudio molecular de resistencias.

5. Conclusiones

- Se observa una selección de alelos salvajes de algunos marcadores moleculares de resistencia tras el tratamiento con lumefantrina, que se considera el primer paso para el inicio de la resistencia a ACTs.
- En el caso de la SP, el descenso en las mutaciones 436A y 540E en el gen *pfdhps* puede indicar un punto de inflexión hacia una mayor sensibilidad a SP. Este es el primer trabajo que ha evaluado este cambio de prevalencia en África tras la incorporación de las ACTs como primera línea de tratamiento. Sin embargo, la aparición de la mutación 581G de *pfdhps*, en Camerún, Gabón y Guinea Ecuatorial puede tener implicaciones importantes en las IPTs y subraya la necesidad de una vigilancia epidemiológica continuada.
- Se debería hacer una vigilancia de los pacientes tratados en España, así como en otros países no endémicos, para comprobar si los tratamientos son efectivos en pacientes inmigrantes que pueden volver a su país sin ser curados efectivamente, comportándose como reservorios de poblaciones parasitarias portadoras de mutaciones de resistencia en su país de origen.
- El estudio de marcadores de resistencia relacionados con los antimaláricos usados como profilaxis puede ser de utilidad en la valoración de futuros tratamientos en zonas endémicas.

RELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS Y ANALÍTICOS DE LA INFECCIÓN POR *Plasmodium falciparum* Y MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A RESISTENCIA EN PACIENTES PROCEDENTES DE ÁFRICA

1. Introducción

Plasmodium falciparum es el principal agente causal de la malaria en el África subsahariana (Steketee y col., 2011). El diagnóstico correcto así como un tratamiento eficaz son fundamentales en el control de la infección, que puede ser asintomática o desarrollar un amplio espectro de manifestaciones, desde fiebre inespecífica a malaria complicada (McMorrow y col., 2011). Esta última se presenta fundamentalmente en dos formas, malaria cerebral y anemia grave, que difieren en sus procesos subyacentes: la malaria cerebral parece estar causada por cepas específicas (John y col., 2010), mientras la anemia grave es el resultado de varios ataques de malaria (Ong'echa y col., 2011). Los datos de la morbilidad y mortalidad de la malaria causada por *P. falciparum* en países endémicos así como en viajeros varían en función de las fuentes consultadas, del 2,7% al 47,3% y del 0,2% al 10,2% respectivamente (Bruneel y col., 2010; Arnáez y col., 2010; Field y col., 2010; Rey y col., 2010; Bouyou-Akotet y col., 2009; Msangeni y col., 2011). En la presentación clínica de la infección y en la respuesta al tratamiento están implicados factores relacionados con el huésped, como la edad y la inmunidad adquirida (Okiro y col., 2009; Carneiro y col., 2010), y las características de las cepas infectantes, como la virulencia y la resistencia a antimaláricos (Doolan y col., 2009; Ibrahim y col., 2007; Wélé y col., 2011).

Se han descrito mutaciones puntuales en determinados genes, que se relacionan con la resistencia genética a antimaláricos, como N51I, C59R, S108N y I164L, en el gen *pf dhfr*, relacionadas con la resistencia a pirimetamina; S436F, A437G, K540E, A581G, en el gen *pf dhps*, relacionadas con la resistencia a sulfadoxina; K76T, en el gen *pf crt*, asociada a resistencia a cloroquina y N86Y y D1246Y, en el gen *pf mdr1*, asociadas con respuestas alteradas a cloroquina (CQ) y otros antimaláricos, como lumefantrina (L), amodiaquina (AQ), mefloquina (MQ) y halofantrina (Petersen y col., 2011). El aumento y la dispersión de las resistencias se relaciona con una mayor morbilidad y mortalidad de la malaria y con un aumento de los casos de malaria complicada, fundamentalmente en pacientes no inmunes (Huijben y col., 2010; Cravo y col., 2001). Por otra parte, el retraso en la realización del diagnóstico o su no confirmación, así como la automedicación se han relacionado con la aparición de resistencia y de malaria complicada (Merman y col., 2005). Sin embargo, en algunos estudios se ha evidenciado una relación negativa entre la presencia de mutaciones puntuales de resistencia y la virulencia del parásito. Este hecho se ha atribuido a la

pérdida de adaptación biológica o “fitness” de los parásitos resistentes, por lo que en ausencia de presión farmacológica la selección natural actuaría a favor de las cepas salvajes. (Felger y col., 2008; Mackinnon y col., 2010). Sin embargo, las cepas salvajes se han relacionado con clínica más grave en algunos estudios (Giha y col., 2006), mientras que en otros la mayor gravedad de la enfermedad se asocia a cepas con mutaciones de resistencia (Welé y col., 2011). En otras publicaciones, no se evidencia ninguna relación entre las cepas salvajes o mutadas con el pronóstico de la infección (Mayengue y col., 2007).

El Hospital Carlos III de Madrid es un centro de referencia de enfermedades tropicales. En él se atiende a pacientes inmigrantes y viajeros en las consultas de Medicina Tropical y Pediatría. Se seleccionaron casos de infección por *P. falciparum*, en pacientes procedentes de África. Se estudió la relación entre distintas variables, epidemiológicas, clínicas y analíticas, con la presencia de alelos salvajes y mutados en locus asociados a resistencia. Nuestro objetivo fue determinar el posible efecto de la presencia de mutaciones de resistencia en el perfil de la infección por *P. falciparum* en África.

2. Materiales y Métodos

Muestra biológica

Las muestras fueron recogidas entre los años 2002 y 2010, antes de que el paciente comenzara el tratamiento. Tras el diagnóstico microscópico, se realizó una PCR múltiple para confirmar la especie (Padley y col., 2003). La extracción de ADN se hizo a partir de 200 µl de sangre completa con EDTA con el kit comercial QIAamp DNA Blood Minikits® (QUIAGEN, Hilden, Alemania). Para el estudio se descartaron las muestras de pacientes con infecciones mixtas, seleccionando 200 casos de infección por *P. falciparum*, que procedían de 18 países: Etiopía, República de Tanzania, Uganda, Mozambique, Guinea Ecuatorial, Gabón, Camerún, República Democrática del Congo, República Central Africana, Angola, Sierra Leona, Burkina Faso, Costa de Marfil, Senegal, Mali, Guinea Bissau, Nigeria y Ghana (figura 2.1). La presencia de mutaciones puntuales en los genes *pf dhfr* (codones 51, 59, 108, 164), *pf dhps* (codones 436, 437, 540 y 581), *pf mdr1* (codones 86 y 1246) y *pf crt* (codón 76) se analizó mediante PCR anidada-RFLP (http://medschool.umaryland.edu/cvd/2002_pcr_asra.htm). Las muestras con alelos salvajes y mutantes, se consideraron mutantes, como en estudios previos. (Dippmann y col., 2008).

Recogida de datos

1.- variables epidemiológicas: de acuerdo con el país de procedencia y la residencia habitual, los pacientes fueron clasificados como: viajero, inmigrante, inmigrante retornado (persona que vuelve a zona endémica, tras una estancia en un país libre de malaria superior a 1 año), o expatriado (persona que permanece en una zona endémica de malaria durante más de 2 años); se recogieron los datos relativos a la raza, el sexo y la fecha de nacimiento.

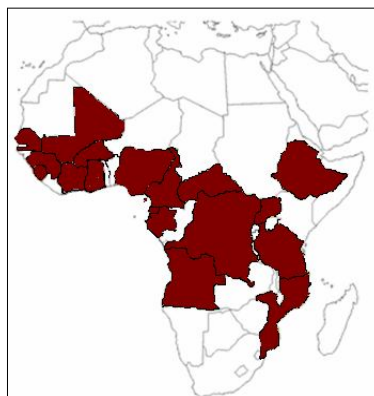


Figura 2.1.- Países de origen de los pacientes.

Se clasificó a los pacientes en tres grupos de edad:

- Menor de 5 años.
- De 5 a 14 años.
- Mayor de 14 años.

En función del grupo de edad y de la estancia en zona endémica de malaria de forma prolongada (inmigrante/expatriado) o no prolongada (viajero-inmigrante retornado), se calculó un “índice de inmunidad” (I_i):

- Los viajeros, inmigrantes retornados y niños menores de 5 años fueron considerados no inmunes ($I_i=0$).
- Los inmigrantes entre 5-15 años y expatriados fueron considerados semiinmunes ($I_i=1$)
- Los inmigrantes mayores de 14 años fueron considerados como inmunes ($I_i=2$).

En los inmigrantes retornados, expatriados y viajeros, se registró la toma de profilaxis para la malaria.

2.- variables clínicas: se registró el tiempo, medido en días, transcurrido desde la salida de zona endémica hasta el diagnóstico de la infección (periodo de incubación o latencia en el diagnóstico; Se consideraron más agresivas las infecciones con menor tiempo de incubación), la temperatura y los síntomas recogidos en la historia clínica.

3.- variables analíticas: Se recogieron los valores de parasitemia, hemoglobina, hematocrito, plaquetas, leucocitos, creatinina, glucosa, transaminasas (AST y ALT), bilirrubina total y la presencia de hemopatías (deficiencia de G6PH, anemia falciforme o hemoglobinopatías que pudiesen ser causa de anemia) al ingreso. Se registró la patología infecciosa intestinal (parásitos, enterobacterias, etc) y la serología del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), considerado como factor de riesgo de malaria complicada (Davenport y col., 2010). La presentación clínica y la analítica, se clasificaron como:

- Clínica:
 - Asintomático
 - Síntomas leves
 - Síntomas graves
- Analítica
 - Normal
 - Alteración leve
 - Alteración grave

Finalmente, se estableció el perfil de la infección, considerando juntos los datos clínicos y analíticos, incluyendo a los pacientes en dos grupos:

1. Malaria complicada, aquellos con al menos un criterio clínico o analítico de infección grave
2. Malaria no complicada, con alguna alteración clínica o analítica, pero sin criterios de gravedad.

Para el estudio de la malaria grave, los pacientes a su vez se estratificaron en aquellos que presentaron malaria cerebral y los que presentaron anemia grave.

Las variables clínicas y analíticas fueron interpretadas según la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de malaria grave (WHO 2000).

Análisis estadístico de resultados:

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS (Statistical Software Package) v.15.0. La asociación de variables categóricas se analizó con la prueba de χ^2 o con el test exacto de Fisher cuando fue apropiado. El análisis de la relación entre la exposición a alelos mutados o salvajes con las distintas variables cuantitativas se realizó mediante la U de Mann-Whitney o el test de Kruskal-Wallis cuando fue adecuado. Para conocer la influencia de las mutaciones de resistencia en el perfil de infección, que incluía datos clínicos y analíticos, y en la malaria grave, se realizó un análisis multivariante. Las variables que mostraron diferencia en el

análisis univariante ($p < 0,2$) se analizaron mediante regresión logística múltiple, para medir la influencia simultánea e independiente de las distintas variables. La estrategia utilizada fue la de “backward stepwise”. El nivel de significación estadística se estableció con un valor de $p \leq 0,05$.

3. Resultados

Las edades de los pacientes de los que se tomaron las muestras, estaban comprendidas entre los 2 meses y los 83 años de edad; el 50% central de la muestra se situó entre 26 y 45,5 años. El 71,3% de los pacientes era de raza negra y el 28,7% de raza blanca; el 63% ($n=126$) varones y el 37% ($n=74$) mujeres. El 26,5% de los inmigrantes retornados, el 4,8% de los expatriados y el 32,4% de los viajeros, lo que corresponde con 30 pacientes del total (15,6%) realizaron profilaxis de malaria. Con estos 30 pacientes se hicieron los análisis estadísticos posteriores, para comprobar el efecto de haber tomado medicación previa en la infección, la anemia y los síntomas neurológicos, frente a no haber tomado ninguna profilaxis, aunque sólo el 26,7%, ($n=8$), refirió hacerlo de forma correcta. En la tabla 2.1 se resume la distribución por grupos de edad, condición e índice de inmunidad. Con respecto a esta última variable, no se observaron diferencias entre varones y mujeres.

100% (n=200)	
Grupos de Edad	
0-5 (4%)	5-14 (12%) >14 (85%)
Condición	
Immigrantes:	35,9%
Viajeros:	17,9%
Inmigrantes retornados:	35,4%
Expatriados :	10,8%
Índice de Inmunidad	
Ii=0	56%
Ii=1	20,9%
Ii=2	22,4%

Tabla 2.1.- Características epidemiológicas.

El periodo de incubación fue menor en pacientes no inmunes frente a inmunes ($p=0,03$), y frente a semi-inmunes ($p=0,07$) y no existió diferencia entre semi-inmunes e inmunes. Además fue menor en pacientes de raza blanca ($p=0,0004$). La parasitemia mostró una tendencia a ser mayor en pacientes no inmunes que en el resto (tabla 2.2).

100% (n=200)			
	Ii=0	Ii=1	Ii=2
Sexo*			
Varón	63,1	63,4	59,1
Mujer	36,9	36,6	40,9
Raza*			
Blanca	31,5	51,2	0
Negra	68,5	48,8	100
Incubación **			
	9	12	14
Parasitemia**			
	0,15	0,09	0,09

Tabla 2.2.- Características en relación con el Índice de inmunidad.(*) (**)mediana

Los resultados de los perfiles clínico, analítico y de la infección se recogen en la tabla 2.3. Del total de pacientes incluidos, 50 (25%) fueron diagnosticados de malaria complicada y el resto se clasificó dentro del grupo de malaria no complicada según los criterios de la OMS. La mortalidad global fue del 4% en los casos de malaria complicada (2/50).

Perfil Clínico					
Incubación: (días)					
	Mínimo	0	50% central de la muestra: 5-17		
	Máximo	92			
Asintomáticos	Síntomas leves:		Síntomas graves:		
8,2%(n=16)	86,2% (n=169)		5,6% (n=11)		
	Astenia, anorexia, malestar general, sudoración, escalofríos, mialgias, artralgias, prurito, rush, síntomas catarrales, tos, náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, cefalea.		Insuficiencia respiratoria, edema pulmonar, rotura de bazo, derrame pericárdico, bradipsiquia, somnolencia, agitación psicomotriz, estupor, convulsiones, coma.		
Perfil Analítico					
Parasitemia (%)			Criterios OMS:		
Mínimo	0,0	<1%	82,6	Negativa*	8
Máximo	37	1-4%	12,4	Leve*	89,4
		>5%	4,1	Grave*	2,7
Analítica		Criterios OMS:			
	Maximo- Mínimo	Normal*		Alteración leve*	Grave*
Hemoglobina (g/dL)	5,3-17,5	46,5		53,5	-
Hematocrito (%)	16,1-52,9	70,1		29,9	-
Plaquetas (x1000/μL)	12-1126	40,4		51	8,6
Leucocitos (x1000/mm3)	2,1-20,7	1,5		92,3	6,2
Creatinina (mg/dL)	0,20-4,50	95,7		3,2	1,1
Glucosa (mg/dL)	54-230	2,7		97,3	-
AST (UI/L)	13-199	77,6		19,9	2,7
ALT (UI/L)	9-198	82		16,4	1,6
Bilirrubina (mg/dL)	0,30-39	68,2		26,8	5,1
Analítica normal:		Alteración leve:		Alteración grave:	
1% (n=2)		78,9% (n=157)		20% (n=40)	
Perfil de la Infección					
Malaria no Complicada: 75% (n=150)			Malaria Complicada 25% (n=50)		

Tabla 2.3.- Perfiles clínico, analítico y de la infección según la definición de OMS de malaria complicada. (*)

Se observó una presentación clínica más severa en los pacientes no inmunes que en los inmunes ($p=0,001$) y semi-inmunes ($p=0,004$). EL 50% de los casos clínicamente asintomáticos fue en inmunes, el 37,5% en semi-inmunes y el 12,5% en no inmunes ($p=0,003$). El 80% de los casos de malaria grave se produjo en no inmunes; y el 10% en semi-inmunes e inmunes respectivamente. La gravedad de la clínica se asoció con la raza blanca ($p=0,0008$).

Los síntomas de malaria cerebral aparecieron en el 3,5% ($n=7$) del total de los pacientes; de ellos el 66,7% eran no inmunes, frente al 16,7% de semi-inmunes ($p=0,002$) e inmunes, ($p=0,002$). Además se observó una asociación entre la presencia de malaria cerebral y el sexo masculino ($p=0,036$), y la raza blanca ($p=0,05$).

Las alteraciones analíticas se relacionan con mayores parasitemias ($p=0,01$), con la raza negra ($p=0,04$), con el sexo (los varones mostraron tendencia a presentar peores perfiles analíticos ($p=0,15$) y con la inmunidad (en inmunes se observó una tendencia a presentar patrones más alterados ($p=0,09$)).

Con respecto a la anemia, los valores medios de hemoglobina y hematocrito fueron menores en pacientes semiinmunes que en no inmunes ($p=0,05$) y que en inmunes, aunque en este caso la diferencia no fue significativa. La hemoglobina media y el hematocrito fueron menores en el grupo de 1 a 5 años, que el de 6 a 14 años y en éstos menores que en los mayores de 14 años ($p<0,00001$). En 183 (91,5%) pacientes se estudiaron patógenos intestinales, que fueron aislados en el 15,3% de ellos, con mayor incidencia en niños menores de 5 años ($p<0,00001$) y en niños menores de 14 años que en adultos ($p=0,00003$). El nivel de hemoglobina fue menor en pacientes con patógenos intestinales ($p=0,005$), y éstos fueron más frecuentes en inmigrantes y expatriados ($p=0,0003$). Además los niveles medios de hemoglobina y hematocrito fueron menores en mujeres que en varones ($p<0,0001$).

Respecto a otros factores de riesgo de malaria grave, 15 pacientes (7,5%) eran pacientes con infección por VIH, 14 de ellos de raza negra, de entre 32 y 56 años de edad, sin diferencias en la distribución de sexos. Cuatro fueron clínicamente asintomáticos y el resto presentó un cuadro de malaria no complicada, excepto 2 casos, con criterios de malaria complicada. En la muestra hubo una mujer embarazada, con un cuadro de malaria no complicada. Anomalías de la hemoglobina (hemoglobina S, hemoglobina C) y déficit de G6PD fueron detectadas en 3 pacientes.

La PCR anidada-RFLP para la detección de mutaciones tuvo una eficacia entre el 95% y 100%. Los porcentajes de alelos salvajes y mutados en la muestra aparecen en la tabla 2.4.

Muestra (n=200)																					
<i>pfdhfr</i> -51		<i>pfdhfr</i> -59		<i>pfdhfr</i> -108		<i>pfdhfr</i> -164		<i>pfdhps</i> -436		<i>pfdhps</i> -437		<i>pfdhps</i> -540		<i>pfdhps</i> -581		<i>pfert</i> -76		<i>Pfmdr1</i> -86		<i>pfmdr1</i> -1246	
S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M
5,5	94,5	6	94	1,5	98,5	100	0	91,5	8,5	25,1	74,9	77,8	22,2	95,5	4,5	4,1	95,9	51,6	48,4	73,3	26,7

Tabla 2.4.- Alelos salvajes y mutados en la muestra (%) (S: Alelo salvaje; M: Alelo mutado)

La prevalencia de alelos salvajes y mutados relacionada con el perfil clínico y analítico, fundamentalmente en relación con las dos principales presentaciones de malaria grave, es decir, anemia y malaria cerebral, se resumen en la tabla 2.5.

Alelo	Clínica (a)	Analítica (a)	Perfil de Infección (a)	Incubación (b)	Parasitemia (b)	Hemoglobina (b)	Hematocrito (b)	Plaquetas (b)	Malaria Cerebral (a)
<i>pfdhfr</i> -N51	0,1	0,1	0,2	9,82	3,7	14,09	41,8	120,8	0,2
<i>pfdhfr</i> -51I	0,06	0,2	0,2	15,9	0,8	12,535	37,7	151,20	0,06
	p=0,4	p=0,4	p=1	p=0,59	p=0,64	p=0,025	p=0,067	p=0,35	p=0,3
<i>pfdhfr</i> -C59	*	0,2	0,2	7,8	3,38	13,8	40,9	117,1	*
<i>pfdhfr</i> -59R		0,2	0,2	16	0,8	12,5	37,7	151,5	
	p=1	p=1	p=1	p=0,11	p=0,94	p=0,05	p=0,13	p=0,30	p=1
<i>pfdhfr</i> -S108	*	1	0,5	6,3	0,03	15,6	44,9	147	*
<i>pfdhfr</i> -108N		0,2	0,3	15,7	0,9	12,5	37,8	149,1	
	p=1	p=0,3	p=0,5	p=0,23	p=0,02	p=0,05	p=0,10	p=0,73	p=1
<i>pfdhps</i> -S436			0,3	15,3	1	12,6	37,9	147,5	
<i>pfdhps</i> -436F/A	**	**	**	18,2	0,3	12,5	38,2	165,7	**
	p=0,6	p=0,02	p=0,01	p=0,30	p=0,66	p=0,65	p=0,92	p=0,17	p=1
<i>pfdhps</i> -A437	0,09	0,1	0,2	14,1	0,8	13,1	39,3	154,3	0,16
<i>pfdhps</i> -437G	0,05	0,2	0,2	16	1	12,4	37,4	147,3	0,03
	p=0,4	p=0,2	p=1	p=0,51	p=0,96	p=0,15	p=0,18	p=0,37	p=0,06
<i>pfdhps</i> -K540	0,06	0,2	0,3	15,53	1,12	12,77	38,3	135,3	0,05
<i>pfdhps</i> -540E	0,08	0,1	0,2	15,57	0,47	12,17	36,9	203,4	0,1
	p=0,7	p=0,2	p=0,4	p=0,27	p=0,0001	p=0,21	p=0,37	p=0,0001	p=0,6
<i>pfdhps</i> -A581	0,05	0,02	0,2	15,9	1	12,67	38	153	
<i>pfdhps</i> -581G	0,3	0,6	0,5	5,5	0,51	11,96	36,8	94,4	**
	p=0,07	p=0,3	p=4	p=0,02	p=0,26	p=0,28	p=0,59	p=0,04	p=1
<i>pfmdr1</i> -N86	0,06	0,2	0,3	13,4	1,3	12,52	37,42	148,3	0,07
<i>pfmdr1</i> -86Y	0,06	0,2	0,2	18,0	0,58	12,71	38,46	148,7	0,06
	p=0,9	p=0,8	p=0,5	p=0,48	p=0,56	p=0,7	p=0,4	p=0,3	P=1
<i>pfmdr1</i> -D1246	0,06	0,1	0,2	15,35	0,75	12,49	37,68	145,79	0,05
<i>pfmdr1</i> -1246Y	0,04	0,4	0,4	15,62	1,36	12,91	38,58	166,96	0,06
	p=1	p=0,01	p=0,04	p=0,40	p=0,50	p=0,11	p=0,18	p=0,08	P=1
<i>pfert</i> -K76	0,1	0,1	0,3	17,43	1,20	12,92	39,98	305,13	*
<i>pfert</i> -76T	0,05	0,2	0,2	15,46	0,97	12,59	37,83	142,16	
	p=0,3	p=1	p=1	p=0,9	p=0,8	p=0,7	p=0,6	p=0,08	p=1

Tabla 2.5.- Perfil clínico, analítico y de la infección relacionado con la presencia de alelos salvajes y mutados. (a) OR: frecuencia de casos con criterios de gravedad relativa a la frecuencia de casos no complicados en presencia de alelos salvajes y en presencia de alelos mutados. (b) Media en los 2 grupos. (*) No existen casos de alteraciones severas en presencia de alelos salvajes. (**) No existen casos de alteraciones severas en presencia de alelos mutados.

La presencia de alelos salvajes o mutados en relación con la inmunidad se recoge en la tabla 2.6.

Alelo	Ri=0/Ri=1(a)	Ri=0/Ri=2(b)	Ri=1/Ri=2(c)
<i>pfdhfr</i> -N51	8	4	0,5
<i>pfdhfr</i> -51I	2,5	2,4	0,9
	p=0,4	p=0,7	p=1
<i>pfdhfr</i> -C59	*	1,4	*
<i>pfdhfr</i> -59R	2,5	2,6	1,05
	p=0,19	p=0,3	p=0,05
<i>pfdhfr</i> -S108	*	1	*
<i>pfdhfr</i> -108N	2,6	2,5	0,9
	p=1	p=1	p=1
<i>pfdhps</i> -S436	2,8	2,4	0,8
<i>pfdhps</i> -436F/A	2	5	2,5
	p=0,5	p=0,5	p=0,2
<i>pfdhps</i> -A437	3	3,3	1,1
<i>pfdhps</i> -437G	2,7	2,3	0,8
	p=0,8	p=0,3	p=0,6
<i>pfdhps</i> -K540	3,1	2,9	0,9
<i>pfdhps</i> -540E	1,5	1,3	0,9
	p=0,08	p=0,08	p=0,9
<i>pfdhps</i> -A581	2,5	2,3	0,9
<i>pfdhps</i> -581G	6	6	1
	p=0,6	p=0,6	p=1
<i>pfmdr1</i> -N86	3,5	2,3	0,6
<i>pfmdr1</i> -86Y	2,1	2,6	1,2
	p=0,19	p=0,7	p=0,18
<i>pfmdr1</i> -D1246	2,8	2,5	0,8
<i>pfmdr1</i> -1246Y	2,6	2,4	0,9
	p=0,8	p=0,9	p=0,9
<i>pfcr1</i> -K76	0,7	**	**
<i>pfcr1</i> -76T	2,9	2,4	0,8
	p=0,08	p=0,5	p=0,04

Tabla.- 2.6: Frecuencia (odds ratio) de alelos salvajes y mutados en:

(a) pacientes no inmunes frente a semi-inmunes

(b) pacientes no inmunes frente a inmunes

(c) semi-inmunes frente a inmunes

(*) no se aislaron cepas salvajes en semi-inmunes.

(**) no se aislaron cepas salvajes en pacientes inmunes.

En el estudio estadístico multivariante comparando malaria complicada con malaria no complicada, se observó como factores independientes de mal pronóstico la inmunidad y la presencia del alelo mutado *pfmdr1*-1246Y (tabla 2.7).

	Malaria no complicada N=150 (%)	Malaria complicada N=50 (%)	Análisis univariante p	Análisis multivariante p
Sexo				
Hombre	90 (60)	36 (72)	0,128	
Mujer	60 (40)	14 (28)		
Edad*	35,1	32,8	0,924	
Raza				
Negra	112 (75,7)	28 (58,3)	0,021	
Blanca	38 (25,3)	22 (41,7)		
Incubación* (días)	12	8	0,099	
Índice Inmunidad				
No inmune	76 (51,3)	35 (72,9)	0,077	0,035
Semimune	34 (23)	7 (14,6)	0,66	
Inmune	38 (25,7)	6 (12,5)		
Hemopatías	1 (0,7)	2 (4,1)	0,161	
Infecc. intestinal	26 (18,8)	6 (13,3)	0,398	
VIH positivo	13 (9,8)	2 (4,5)	0,363	
Profilaxis				
Si	20 (13,7)	10 (21,7) (20)	0,190	
No	130 (86,3)	40 (80)		
<i>pfldhfr-51I</i>	141 (94)	48 (96)	0,734	
<i>pfldhfr-59R</i>	140 (93,3)	48 (96)	0,734	
<i>pfldhfr-108N</i>	147 (98,7)	49 (98)	1	
<i>pfldhfr-I164</i>	0	0	1	
<i>pfldhps-436A</i>	17 (11,4)	0 (0)	0,08	
<i>pfldhps-437G</i>	111 (74,5)	38 (76)	0,832	
<i>pfldhps-540E</i>	36 (24,3)	8 (16)	0,221	
<i>pfldhps-581G</i>	6 (4,1)	3 (6)	0,695	
<i>pfprt-76T</i>	140 (95,2)	48 (98)	0,682	
<i>pfmdrI-86Y</i>	70 (48,6)	23 (47,9)	0,934	
<i>pfmdrI-1246Y</i>	34 (22,8)	18 (39,1)	0,029	0,027

Tabla 2.7.- Malaria no complicada vs malaria complicada. (*mediana)

Dado que la patogenia de la malaria cerebral difiere de la anemia complicada se decidió estratificar a los pacientes para conocer si los factores de riesgo diferían entre ambas patologías.

Los síntomas de malaria cerebral aparecieron en el 3,5% (n=7) del total de los pacientes; debido a su bajo número se decidió agrupar a los sujetos en aquellos que presentaban síntomas neurológicos (111, 56,3%) y los que no mostraron ninguna sintomatología neurológica (86, 43,7%).

La edad se asoció con el desarrollo de síntomas neurológicos; aunque la mediana de los sujetos con síntomas neurológicos era 0,5 años mayor que la de los pacientes sin síntomas, la media era 4 años mayor.

La falta de inmunidad demostró ser un factor asociado al desarrollo de sintomatología neurológica, y se observó una tendencia estadística con el alelo salvaje *pfldhps-S436* asociado a la ausencia de síntomas neurológicos.

Los resultados del análisis estadístico se muestran en la tabla 2.8

	No síntomas neurológicos N=86 (%)	Síntomas neurológicos N=111 (%)	Análisis univariante p	Análisis multivariante p
Sexo				
Hombre	53 (61,7)	70 (63,1)	0,837	
Mujer	33 (38,3)	41 (36,9)		
Edad*	35	35,6	0,059	0,013
Raza				
Negra	66 (76,7)	74 (67,3)	0,145	
Blanca	20 (23,3)	37 (32,7)		
Incubación *(días)	12	10	0,302	
Parasitemia (%)	2	2	0,453	
Índice Inmunidad				
No inmune	35 (40,7)	76 (69,1)	0,0001	0,003
Semiinmune	27 (31,4)	14 (12,7)	0,29	
Inmune	24 (27,9)	20 (18,2)		
Infecc. intestinal	19 (23,8)	13 (12,6)	0,049	
Hemopatías	2 (2,4)	1 (0,9)	0,579	
VIH positivo	8 (10,7)	7 (6,9)	0,38	
Profilaxis (sí)	8 (9,5)	22 (20,4)	0,04	
<i>pfldhfr-51I</i>	81 (94,2)	105 (94,6)	1	
<i>pfldhfr-59R</i>	79 (91,9)	106 (95,5)	0,29	
<i>pfldhfr-108N</i>	85 (100)	108 (97,3)	0,259	
<i>pfldhfr-1164</i>	0	0	1	
<i>pfldhps-436A</i>	12 (14)	5 (4,5)	0,02	0,109
<i>pfldhps-437G</i>	64 (74,4)	82 (74,5)	0,984	
<i>pfldhps-540E</i>	23 (27,1)	21 (19,1)	0,187	
<i>pfldhps-581G</i>	1 (1,2)	7 (6,4)	0,141	
<i>pfprt-76T</i>	78 (92,9)	108 (99,1)	0,044	
<i>pfmdrI-86Y</i>	43 (53,1)	50 (45,9)	0,325	
<i>pfmdrI-1246Y</i>	21 (25)	31 (28,4)	0,593	

Tabla 2.8.- Presencia de síntomas neurológicos vs ausencia de síntomas neurológicos (*mediana)

Finalmente, se realizó un estudio para conocer qué factores epidemiológicos y características de los aislados de *P. falciparum* podían relacionarse con la anemia complicada. Atendiendo a los valores de hemoglobina y hematocrito, ninguno de los sujetos incluidos cumplía los criterios de la OMS para clasificarlo como anemia grave. Por esa razón, se estratificó a los pacientes en aquellos que presentan anemia (131, 70,1%) de los que no tenían una cifras normales de hematocrito (56, 29,9%). Los pacientes con alteraciones hematológicas fueron previamente excluidos del análisis. Se asociaron con el desarrollo de anemia el sexo femenino, un período de incubación más largo y, en menor medida, la presencia de infecciones intestinales. Aunque la presencia de los alelos mutados *pfldhfr-108N* y *pfldhps-437G* fue más frecuente en los sujetos con anemia, no resultó significativa. Aunque no se vio ninguna relación entre el perfil de la infección (malaria complicada vs malaria no complicada, tabla 2.7) con la infección por VIH, en estos pacientes se observó una tendencia a presentar menores niveles de hemoglobina. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.9.

	No anemia N=56 (%)	Anemia N=131 (%)	Análisis univariante p	Análisis multivariante p
Sexo				
Hombre	51 (91,1)	64 (48,9)	<0,0001	<0,0001
Mujer	5 (8,9)	67 (51,1)		
Edad*	37,7	38,5	0,244	
Raza				
Negra	35 (63,6)	98 (74,8)	0,123	
Blanca	21 (36,4)	33 (25,2)		
Incubación* (días)	9	11	0,078	0,013
Parasitemia (%)	2	2	0,347	
Índice Inmunidad				
No inmune	36 (65,5)	70 (53,4)	0,161	
Semiinmune	8 (19,5)	29 (22,1)	0,68	
Inmune	11 (20)	32 (24,4)		
Infecc. intestinal	6 (10,9)	24 (19,8%)	0,144	
VIH positivo	1 (2)	14 (12)	0,041	0,068
Profilaxis (sí)	9 (16,7)	20 (15,4)	0,828	
<i>pfldhfr-51I</i>	51 (91,1)	126 (96,2)	0,169	
<i>pfldhfr-59R</i>	51 (91,1)	125 (95,4)	0,309	
<i>pfldhfr-108N</i>	54 (96,4)	130 (100)	0,09	
<i>pfldhfr-1164</i>	0	0	1	
<i>pfldhps-436A</i>	5 (8,9)	12 (9,2)	0,948	
<i>pfldhps-437G</i>	37 (66,1)	101 (77,7)	0,097	
<i>pfldhps-540E</i>	11 (19,6)	30 (23,3)	0,587	
<i>pfldhps-581G</i>	2 (3,6)	6 (4,7)	1	
<i>pfert-76T</i>	53 (96,4)	126 (97,7)	0,636	
<i>pfmdrI-86Y</i>	28 (51,9)	59 (46,5)	0,506	
<i>pfmdrI-1246Y</i>	18 (32,7)	33 (25,8)	0,337	

Tabla 2.9.- Presencia de anemia vs ausencia de anemia. (*mediana)

4. Discusión

Actualmente las estrategias de tratamiento están basadas en la monitorización de la eficacia de los antimaláricos, ya que la resistencia a fármacos es considerada una de las causas más importantes de la morbimortalidad de la malaria (Picot y col., 2009). Algunos estudios apuntan a que las cepas resistentes causan una infección menos grave, debido a un coste en su adaptabilidad biológica, aunque los datos son escasos y arrojan resultados a veces contradictorios (Welé y col., 2011).

La prevalencia de las resistencias en estos pacientes estudiados refleja la prevalencia de resistencias en África, con una elevadísima proporción de muestras con alelos relacionados con resistencia a cloroquina y pirimetamina mutados (Naidoo y col., 2011). El perfil de los pacientes fue establecido con respecto a la inmunidad adquirida frente a la malaria. Posteriormente analizamos si la presentación de la infección, y en concreto en las dos formas más habituales de malaria complicada, que son la anemia grave y la malaria cerebral, considerando además otras variables epidemiológicas y clínicas, están relacionadas con la presencia de cepas salvajes o mutadas en locus asociados a resistencia a antimaláricos.

La presentación más frecuente en nuestros pacientes fue la de un cuadro de malaria no complicada, tanto en los pacientes inmunes como en los pacientes no inmunes. El perfil de la infección fue grave en el 25% de los casos, aunque clínicamente la infección presentó criterios de extrema

gravidad sólo en el 5,6% de los pacientes. Los cuadros de malaria complicada están significativamente asociados a la ausencia de inmunidad (tabla 2.7). Los pacientes no inmunes presentan periodos de incubación menores con parasitemias más elevadas y cuadros clínicos más severos. Sin embargo, el perfil analítico está más alterado en los pacientes inmunes. En concreto, con respecto a los valores de hemoglobina y hematocrito los pacientes inmunes tienen cifras significativamente menores. En el contexto de la infección por *P. falciparum* este hecho suele ser el resultado de ataques repetidos de malaria pero, en países tropicales y subtropicales, es frecuente la asociación con otras infecciones (Magalhães y col., 2011). En nuestra muestra detectamos una relación estadísticamente significativa entre la presencia de infecciones por parásitos intestinales y enterobacterias y la anemia (Anong y col., 2010; Brooker y col., 2008). Es de destacar que los varones presentaron peores perfiles analíticos y de infección, a pesar de que las mujeres presentaban valores de hemoglobina y hematocrito significativamente peores (tabla 2.9).

En cuanto al análisis de la relación con los alelos de resistencia, el estudio presenta varias limitaciones. Las infecciones mixtas, como es habitual en estos estudios, se interpretaron como alelos mutados. Además los alelos mutados en algunos casos se hallaron en una prevalencia muy alta (superior al 98%) o muy baja (inferior al 4,5%) (tabla 2.4). Por último, las parasitemias de los pacientes incluidos en nuestro estudio fueron en general muy bajas.

Por tanto, la interpretación de los resultados de nuestra muestra en cuanto a la relación entre la mayor o menor severidad de la infección y la presencia o ausencia de cepas salvajes o mutadas es compleja y debe ser realizada con precaución. Una parte importante de los pacientes eran viajeros e inmigrantes; es probable que estos pacientes presenten un comportamiento diferente frente a la enfermedad del que presentan los africanos residentes, relacionado con la demanda de atención médica rápidamente tras los primeros síntomas de la infección, y por ello no observamos cuadros de malaria con altas parasitemias; esto puede haber influido a su vez en el hecho de que no hayamos encontrado ningún caso de anemia grave entre los pacientes del estudio.

De los resultados obtenidos, a pesar de las limitaciones del análisis, se desprende que la existencia de alelos salvajes podría asociarse a infección más severa: El periodo de incubación de la enfermedad fue, en la mayoría de los casos, menor en presencia de alelos salvajes, acompañada en general de parasitemias más elevadas, lo que podría indicar que las cepas salvajes se comportan de forma más agresiva en nuestra muestra, es decir, que en menos tiempo producen parasitemias más elevadas. El comportamiento de las muestras con el alelo salvaje *pfdhps*-S436 es un ejemplo de este patrón: se asocia a un perfil analítico y de la infección significativamente peor, con una tendencia a relacionarse con la presencia de síntomas neurológicos graves; Además, en la comparación de los cuadros de malaria no complicada vs. malaria complicada en conjunto la presencia de cepas mutadas de este alelo muestra tendencia estadística a no causar complicaciones.

Con respecto a la anemia, los niveles de hemoglobina y hematocrito son en general menores en presencia de alelos mutados. Considerando el periodo de incubación, este dato podría ser la consecuencia de un tiempo de infección más prolongado y no el efecto de cepas más agresivas. Es decir, la mayor duración de una infección leve, y por tanto cuyo diagnóstico se retrasa, provoca una mayor anemia. Sin embargo, en el análisis multivariante no salió nada significativo quizás por la frecuencia tan elevada de cepas mutadas con respecto a las salvajes. Comparamos las cifras de plaquetas en pacientes que presentaban cepas salvajes y mutadas, por ser un parámetro menos afectado por otros factores que la hemoglobina o el hematocrito. La trombopenia se asocia en general a la presencia de alelos salvajes, lo que representa un comportamiento más agresivo de estas cepas.

En cuanto a la malaria cerebral, la incidencia fue escasa en los pacientes incluidos en nuestro estudio y sólo se observó en la muestra una relación entre la presencia del alelo salvaje *pf dhps*-A437 y los casos de malaria cerebral.

El comportamiento de la infección en estos pacientes fue más severo en los no inmunes ($I_i=0$), como era de esperar. Analizamos la relación entre la prevalencia de cepas mutadas o salvajes, ya que hay diversos trabajos en los que se observa una mayor prevalencia de poblaciones salvajes en las personas inmunes (Klein y col., 2008). Sin embargo, si observamos los datos de la tabla 2.6, aunque la potencia estadística de los resultados es muy pobre, parece existir una mayor presencia de alelos mutados en pacientes con algún grado de inmunidad. Este hecho supondría un factor a favor del establecimiento de reservorios de cepas resistentes, ya que en estos pacientes es más probable que la infección pase desapercibida, al no presentar clínica, y no sea tratada.

El retraso en el diagnóstico y en el tratamiento efectivo son considerados como factores determinantes de la aparición de malaria severa en África (Meerman y col., 2005). Paradójicamente este retraso puede producirse si las cepas mutadas causan infecciones paucisintomáticas, lo que provocaría un aumento de la morbilidad por empeoramiento de la anemia. Por tanto, en el ámbito de la expansión de las resistencias en África, la infección prolongada y por tanto la anemia severa, podría no ser sólo la consecuencia de un tratamiento no eficaz, o de infecciones sucesivas (Field y col., 2010). Es importante considerar asimismo que la infección asintomática convierte al paciente en un reservorio de parásitos de difícil control en los programas de erradicación de la malaria (Alonso y col., 2011; Sutherland y col., 2011). Es decir, la pérdida de adaptabilidad biológica en las cepas mutadas parece una estrategia en el parásito para aumentar sus posibilidades de ser transmitido.

Es de destacar el comportamiento de la mutación en *pf dhfr*-581G y, sobre todo, la mutación *pf mdr1*-1246Y. En presencia del alelo 581 mutado observamos tiempos de incubación significativamente menores, además de cifras de hemoglobina y hematocrito menores, que aparecen a pesar de parasitemias más bajas, con recuentos de plaquetas y una presentación clínica

significativamente más graves. En la muestra también observamos que la presencia del alelo mutado *pfmdr1*-1246Y se encuentra significativamente asociado a un perfil más grave de la infección (tabla 2.7), aunque se observa una tendencia a presentar alteraciones del hematocrito y plaquetas más graves en presencia del alelo salvaje (tabla 2.5).

Tras la incorporación de las ACTs como primera línea de tratamiento se ha observado un aumento de reinfecciones por poblaciones del parásito que presentan el alelo salvaje *pfmdr1*-D1246 (Dokomajilar y col., 2006). Un seguimiento del comportamiento de este alelo es esencial, para evaluar su posible impacto en la eficacia de las nuevas combinaciones, ya que al estar el alelo salvaje asociado a infecciones menos graves el diagnóstico de las infecciones en las que esté presente podría retrasarse y con ello se podría demorarse la detección de lo que es considerado como el primer escalón en la resistencia a ACTs.

La presencia en nuestra muestra del alelo mutado 581G, escasamente descrito en África, relacionado con un perfil más severo de la infección merece también una especial mención. Su aparición se relaciona a un alto nivel de resistencia *in vitro* así como a fracaso de tratamiento *in vivo* con SP (Gesase y col., 2009). La OMS recomienda que las mujeres embarazadas reciban al menos dos dosis de SP como tratamiento preventivo intermitente (Tratamiento Preventivo Intermitente en embarazadas, TPIe; “Intermittent Preventive Treatment in Pregnant Women”, IPTp) en África subsahariana. Esta recomendación es ampliamente seguida por muchos países africanos, para evitar la infección en esta población susceptible y con ello evitar problemas en el desarrollo del feto (Gosling y col., 2010). Se han publicado estudios en relación con la selección de parásitos portadores de este alelo mutado en mujeres embarazadas, asociado a un aumento del nivel de parasitemia y datos de inflamación crónica de la placenta, relacionado con el uso reciente de TPIe. En estos trabajos se plantea que el uso de TPI podría favorecer las infecciones por cepas multirresistentes (Mockenhaupt y col., 2007; Harrington y col., 2009). En nuestro trabajo, la asociación con esta mutación con una mayor virulencia de la infección podría estar relacionada con el hecho de ser una mutación no adaptada, por ser una mutación de reciente aparición. En cualquier caso, debe ser vigilada, ya que podría poner en peligro dicha terapia.

La virulencia de las cepas con alelos salvajes o mutados no es uniforme en nuestra muestra, en los alelos estudiados. Es posible que la base molecular de este comportamiento no sea sólo la mutación puntual de descritas clásicamente, como se ha planteado anteriormente (Schneider y col., 2008). Serían necesarios y deseables más estudios para comprender exactamente el comportamiento de las mutaciones asociadas a resistencia en *P. falciparum*, por sus implicaciones en el tratamiento de la infección.

5. Conclusiones

- Las cepas con mutaciones en algunos locus asociados a resistencia parecen presentar una menor virulencia en la infección. Esto podría conllevar inicialmente a un comportamiento menos agresivo, por provocar infecciones menos sintomáticas, con el consiguiente retraso en su diagnóstico, lo que favorecería la aparición de infecciones con mayor morbilidad a largo plazo.
- El retraso en el diagnóstico hará de estos pacientes un reservorio muy eficaz para las cepas resistentes, lo que favorece la expansión de las resistencias.
- La aparición de mutaciones escasamente descritas y por tanto no establecidas en la población, como la mutación *pf dhps*-581G, podría suponer un aumento de la virulencia, con la importancia añadida al hecho de la resistencia que esto tendría.
- La mutación *pf mdr1*-1246Y se encuentra significativamente asociado a un perfil más grave de la infección. Un seguimiento del comportamiento de este alelo es esencial, para evaluar su posible impacto en la eficacia de las ACTs.
- Los pacientes incluidos en este trabajo son un reflejo de la epidemiología de las resistencias de las zonas endémicas. Con una clasificación cuidadosa de los pacientes y los factores implicados en la infección se puede contribuir al estudio de variables relacionadas con la mayor o menor gravedad de la malaria, así como a la elaboración del mapa de epidemiología de las resistencias a antimaláricos, determinante fundamental de las políticas de tratamiento y programas de control en países endémicos.
- Para esclarecer el impacto de la resistencia en el curso de la infección es recomendable que estos estudios se sigan realizando de forma continuada.

VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Plasmodium falciparum* EN GUINEA ECUATORIAL Y SU RELACIÓN CON MUTACIONES ASOCIADAS A RESISTENCIA A ANTIMALÁRICOS

1. Introducción

Durante la fase pre eritrocítica de la infección por *Plasmodium falciparum* se expresan diferentes proteínas en la superficie del merozoíto (Soulama y col., 2011;). De ellas la más abundante es la Proteína de Superficie del Merozoíto 1 (MSP1, “Merozoite Surface Protein 1”) (Roy y col., 2009). Esta proteína se ancla a la pared formando una estructura compleja, constituida por varias subunidades. Su extremo carboxiterminal, de 19 aminoácidos (C₁₉) es una región muy conservada que parece tener un papel fundamental en la invasión del eritrocito (Kadekoppala y col., 2010). La proteína MSP1 es muy inmunogénica y durante la infección se generan anticuerpos frente a los diferentes fragmentos que la componen (Gilson y col., 2008; Beeson y col., 2008). Actualmente la caracterización del gen que codifica esta proteína es útil en: estudios de eficacia terapéutica *in vivo*, para diferenciar recrudescencias de reinfecciones (Liljander y col., 2009) y en el diseño de vacunas (Sutton y col., 2010).

La proteína MSP1 es codificada por el gen *pfmsp1*, localizado en el cromosoma 9 del parásito. El gen se divide en 17 bloques, en función de su secuencia: bloques conservados, 1, 3, 5, 12 y 17; bloques semiconservados, 7, 11, 13 y 15 y bloques variables, 2, 4, 6, 8, 10, 14 y 16. La secuencia de nucleótidos del bloque variable 2 permite diferenciar 4 familias, *pfmsp1*-K1, *pfmsp1*-MAD20, *pfmsp1*-RO33 (Kiwanuka, 2009) y *pfmsp1*-MR, resultado de procesos de recombinación entre las familias *pfmsp1*-MAD20 y *pfmsp1*-RO33 (Takala y col., 2006).

Las infecciones por *P. falciparum* están causadas por varias poblaciones genéticamente distintas (Kang y col., 2010; Koepfli y col., 2011). Para cuantificar el número de poblaciones presentes en una infección se utiliza el término de multiplicidad de la infección o índice MOI (“Multiplicity Of Infection”), definido como el número medio de genotipos detectados en un individuo infectado (Mayengue y col., 2011). La variabilidad genética se produce fundamentalmente por recombinación genética durante la reproducción sexual del parásito, que tiene lugar en el estómago del mosquito, aunque también están implicados fenómenos de recombinación intragénica en la división mitótica, durante la reproducción asexual en el hospedador humano (Hoffmann y col., 2003). El MOI varía en función de la endemidad de la malaria. En áreas de hiper u holoendemidad, los factores que se han relacionado con el MOI son la edad y la inmunidad adquirida frente a la malaria de los pacientes, aunque la relación con la edad desaparece en áreas de baja endemidad (Anderson y col., 2000, Muller y col., 2001). En algunos estudios, en zonas

hiperendémicas se observa que el MOI aumenta con la edad, (Henning y col. 2004); en otros trabajos no se ha evidenciado esta relación (Issifou y col., 2001; Noranate y col., 2009).

Una de las limitaciones en el desarrollo de vacunas efectivas frente a la malaria causada por *P. falciparum* es la enorme diversidad genética de las poblaciones del parásito, que limita la eficacia de la inmunidad adquirida frente a la malaria. Además, tras la realización de ensayos clínicos en el terreno con vacunas diseñadas con determinadas secuencias de la proteína MSP1, se ha observado un aumento de poblaciones de *P. falciparum* que presentan secuencias de esta proteína distintas a las que han sido usadas para la inmunización de la población, lo que parece debido a un proceso de selección poblacional (Takala y col., 2009; Pan y col., 2010). Sin embargo, en la actualidad y hasta que no exista una vacuna eficaz, el principal problema en el control de la infección por *P. falciparum* es la aparición y la expansión de la resistencia a antimaláricos (Abdulla y col., 2011). *P. falciparum* ha desarrollado resistencias a cualquier antipalúdico de los que se dispone a día de hoy (Mu y col., 2010).

El objetivo de este trabajo es analizar la variabilidad genética en aislados de *P. falciparum* de Guinea Ecuatorial y conocer la posible influencia de las resistencias en esta variabilidad genética, teniendo en cuenta el cambio del tratamiento de primera intención realizado en el país en 2007.

Para ello estudiamos la relación entre distintas mutaciones puntuales asociadas a resistencia a antimaláricos y la variabilidad del gen *pfmsp1*, en infecciones por *P. falciparum* en pacientes procedentes de Guinea Ecuatorial diagnosticados y tratados en el Hospital Carlos III de Madrid.

2. Materiales y Métodos

Área de muestreo:

Situado en África Central, Guinea Ecuatorial es un país con una transmisión hiperendémica de malaria, con una tasa de inoculación entomológica de 10-100 picaduras por persona y año. El 85% de los casos están causados por *P. falciparum*. Su territorio se divide en dos regiones, una región continental, caracterizada por dos estaciones secas (de diciembre a febrero y de junio a agosto) y dos lluviosas (de marzo a mayo y de septiembre a noviembre), y una región insular, con una estación seca (de diciembre a mayo) y una lluviosa (de junio a noviembre) (Pardo y col., 2006). El movimiento de población entre ambas regiones es constante. En 2007, tras la realización de un estudio de eficacia terapéutica *in vivo*, la combinación Artesunato-Amodiaquina (AS+AQ), se adoptó como primera línea de tratamiento de la malaria no complicada, en sustitución de la Sulfadoxina-Pirimetamina (SP). Ésta última combinación se mantiene como tratamiento para la terapia preventiva intermitente en la mujer embarazada (Charle y col., 2009).

Muestra biológica:

Se tomaron muestras de sangre de pacientes procedentes de Guinea Ecuatorial con sospecha de infección por *P. falciparum*. Las muestras se recogieron antes de que al paciente se le administrara tratamiento. Se seleccionaron 148 muestras durante un periodo comprendido entre los años 2002 y 2010. Se registró el mes del año en que se diagnosticó la infección. Para el análisis de datos se establecieron dos grupos, el primero formado por muestras tomadas antes del cambio de tratamiento en Guinea Ecuatorial, entre 2002 y 2006, y el segundo por muestras recogidas después de la introducción de AS+AQ como primera línea de tratamiento, entre 2008 y 2010. Para evaluar la diferencia en la intensidad de la transmisión de la malaria entre las épocas seca y lluviosa, sólo se consideraron las muestras recogidas en los meses en los que estas dos estaciones, lluviosa (septiembre, octubre y noviembre) y seca (diciembre, enero, y febrero), coinciden en la región insular y en la región continental, seleccionándose 62 muestras del total. A los pacientes incluidos en el estudio se les calculó un “índice de inmunidad” (I_i), en función de la edad (menor de 5 años, de 5-14 y mayor de 14 años) y la residencia en zona endémica de malaria de forma prolongada (inmigrante/expatriado) o no (viajero-inmigrante retornado). Los viajeros, inmigrantes retornados y niños menores de 5 años fueron considerados no inmunes ($I_i=0$); los inmigrantes entre 5-15 años y expatriados semiinmunes ($I_i=1$) y los inmigrantes mayores de 14 años inmunes ($I_i=2$).

La extracción de ADN se hizo a partir de 200 µl de sangre con EDTA con el kit comercial QIAamp DNA Blood Minikits®, (QUIAGEN, Hilden, Alemania). Se descartaron las muestras de pacientes con infecciones mixtas. Tras el diagnóstico por microscopía, se realizó una PCR múltiple para confirmar la especie (Padley y col., 2003).

Análisis moleculares:

La presencia/ausencia de mutaciones puntuales en los genes *pf dhfr* (codones 51, 59, 108, 164), *pf dhps* (codones 436, 437, 540 y 581), *pf mdr1* (codones 86 y 1246) y *pf crt* (codón 76) se estudió mediante nested PCR-RFLP (http://medschool.umaryland.edu/cvd/2002_pcr_asra.htm). Las muestras con alelos salvajes y mutantes, se consideraron mutantes. (Dippmann y col., 2008). Para la detección de las familias alélicas *pfmsp1*-K1, *pfmsp1*-MAD20 y *pfmsp1*-RO33 se utilizó una PCR anidada (Robert et al 1989). Se diferenciaron los fragmentos en función del número de pares de bases (pb) del fragmento amplificado. Para el análisis de resultados se consideraron las familias alélicas independientemente y posteriormente se calculó el MOI, como el número total de alelos diferentes presentes en un aislado.

Análisis estadístico de resultados:

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS (Statistical Software Package) v.15.0. La comparación de las mutaciones de resistencia en los dos periodos estudiados se analizó con la prueba de χ^2 o con el test exacto de Fisher, cuando fue adecuado. La relación entre la exposición a alelos mutados o salvajes con la multiplicidad de la infección (MOI) se analizó con la U de Mann-Whitney.

3. Resultados

La amplificación por PCR de los alelos de *msp1* fue eficaz en el 90,5% de los casos (n=134). De estos casos seleccionados, 93 (69,4 %) pertenecían al primer grupo (2002-2006, anterior al cambio de tratamiento) y 41 (30,6%) al segundo grupo (2008-2010, posterior al cambio de tratamiento). El 82,6% de los pacientes presentó una parasitemia inferior al 0,1% (rango: (0% - 37%,). No se observaron diferencias en las distribuciones de sexo, índice de inmunidad ni parasitemia en los dos grupos de pacientes. La distribución de los 62 pacientes seleccionados para el análisis de la relación entre la estacionalidad y la presencia o ausencia de cepas salvajes o mutadas no presentó diferencias en los dos periodos de tiempo establecidos con respecto a las estaciones seca y lluviosa.

pfmsp1-K1: la familia *pfmsp1*-K1, amplificó en 106 muestras (79,1%). En 69 de ellas (65,1%) se halló un solo alelo. El número máximo de alelos de esta familia detectado en una muestra fue de 4 (tabla 3.1). En el primer grupo la longitud de los fragmentos de amplificación detectados fue entre 110pb y 440pb; en el segundo grupo amplificaron fragmentos de entre 110pb y 580pb.

n° de alelos de K1	Periodos de Estudio		Total
	2002-2006	2008-2010	
0	22	6	28
1	55	14	69
2	13	11	24
3	3	8	11
4	0	2	2
	93	41	134

Tabla 3.1.- Distribución de los alelos *pfmsp1*-K1 en los dos periodos.

El número de alelos en la familia *pfmsp1*-K1 en las muestras analizadas aumentó con el tiempo desde 2002 a 2010. Comparando las muestras en las que se detectó un solo alelo de K1 con las que tuvieron más de uno, se observó una diferencia estadísticamente significativa (p=0,0001) entre los

dos periodos en las que se encuentra dividida la muestra. No existió ninguna relación entre el número de estos alelos y la estacionalidad de las lluvias.

pfmsp1-MAD20: la familia *pfmsp1-MAD20* se detectó en 63 muestras (43%). En 39 de ellas (61,9%) amplificó un solo alelo. El número máximo de alelos aislados en una muestra fue de 6 (tabla 3.2). En el primer grupo la longitud de los fragmentos amplificados fue entre 100pb y 350pb; en el segundo amplificaron fragmentos de entre 120pb y 700pb. Existieron diferencias significativas entre los dos periodos de estudio en cuanto a la presencia o ausencia de alelos ($p=0,01$), pero no en el número de alelos en las muestras de los dos grupos. No se observó ninguna relación entre el número de estos alelos y la estacionalidad de las lluvias.

n° de alelos de MAD20	Periodos de Estudio		Total
	2002-2006	2008-2010	
0	56	15	71
1	24	15	39
2	13	6	19
3	0	1	1
4	0	3	3
6	0	1	1
	93	41	134

Tabla 3.2.- Distribución de los alelos *pfmsp1-MAD20* en los dos periodos.

pfmsp1 RO33: la familia *pfmsp1-RO33* se aisló en 68 muestras (50,7%). El alelo detectado en la mayoría de estos pacientes fue de 150pb ($n=60$, 88,2%) (tabla 3.3). En el segundo grupo se detectaron alelos de tamaños distintos y superiores a 150pb (entre 190 y 500pb)

n° de alelos de RO33	Periodos de Estudio		Total
	2002-2006	2008-2010	
0	55	11	66
1	38	30	68
	93	41	134

Tabla 3.3.- Distribución de los alelos *pfmsp1-RO33* en los dos periodos.

La aparición de algún alelo de la familia *mshp1-RO33* aumenta de forma significativa en el segundo periodo de estudio ($p=0,0005$). En el segundo periodo (2008-2010) aparecieron además alelos de tamaño superior. Si comparamos la presencia de alelos con la estacionalidad de las lluvias, podemos comprobar que existe una cierta tendencia a que aparezcan alelos de RO33 ($p=0,19$) en la estación seca.

Multiplicidad de la Infección (MOI): en los 8 años en los que se recogieron las muestras incluidas en el estudio encontramos un aumento significativo del MOI de las infecciones ($p<0,0001$). El MOI medio en el primer periodo (2002-2006) fue de 1,8 mientras que en el segundo periodo (2008-2010) fue de 3,4. La diferencia en las distribuciones de MOI en los dos grupos entre las estaciones seca (MOI medio 1,6) y lluviosa (MOI medio, 1,2) no fue estadísticamente significativa.

Mutaciones de resistencia: la PCR para la detección de mutaciones de resistencia resultó eficaz en el 98% de las muestras. La presencia de alelos salvajes y mutados y las diferencias entre los dos grupos se recogen en la tabla 3.4. No se hallaron diferencias entre los haplotipos (mutación triple, cuádruple o quintuple) entre los dos periodos de tiempo.

	2002-2005 (n=93)		2008-2010 (n=41)		p
	S	M	S	M	
<i>pfdhfr-51</i>	1,1	98,9	4,9	95,1	0,2
<i>pfdhfr-59</i>	3,2	96,8	2,4	97,6	1
<i>pfdhfr-108</i>	0	100	0	100	
<i>pfdhfr-164</i>	100	0	100	0	
<i>pfdhps-436</i>	83,9	16,1	100	0	0,005
<i>pfdhps-437</i>	28	72	17,1	82,9	0,1
<i>pfdhps-540</i>	79,3	20,7	82,9	17,1	0,6
<i>pfdhps-581</i>	97,8	2,2	92,7	7,3	0,1
<i>pfmdr1-86</i>	47,8	52,2	52,5	47,5	0,6
<i>pfmdr1-1246</i>	69,2	30,8	97,6	2,4	0,0002
<i>pfcr-76</i>	1,1	98,9	2,4	97,6	0,5

Tabla 3.4.- Alelos salvajes (S) y mutados (M) (%) en los dos grupos.

Se observó un aumento significativo de los alelos *pfdhps-437* mutados durante la estación seca ($p=0,007$) y una tendencia de los alelos mutados *pfmdr1-86* ($p=0,07$) y del alelo *pfmdr1-1246* ($p=0,1$) a aumentar durante esta misma estación. No existió asociación entre el resto de alelos con la época del año.

Relación entre el MOI y la presencia/ausencia de alelo mutado: en el análisis de la relación entre la presencia de alelos salvajes y mutados y el MOI en los 134 pacientes se observaron 3 patrones (tabla 3.5). En primer lugar aquel en el que el MOI en presencia de poblaciones salvajes y resistentes fue similar; en segundo lugar, aquel en el que el MOI fue más alto en presencia de aislados mutados, sólo significativo en el caso del alelo *pfmdr1-86* Y ($p=0,04$), y en tercer lugar

aquel en el que el MOI es más elevado en presencia de aislados salvajes, sólo significativo en el caso de los alelos *pfmdr1*-D1246 ($p=0,02$) y *pfdhps*-K540 ($p=0,08$).

2002-2010																		
Alelos	<i>pfdhfr-51</i>		<i>pfdhfr-59</i>		<i>pfdhps-436</i>		<i>pfdhps-437</i>		<i>pfdhps-540</i>		<i>pfdhps-581</i>		<i>pfmdr1-86</i>		<i>Pfmdr1.1246</i>		<i>pfcr1-76</i>	
	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M
	1,33	2,40	1,50	2,40	2,37	2,40	2,33	2,39	2,49	1,81	2,34	2,80	2,02	2,67	2,53	1,76	2,50	2,36
MOI	p=0,2		p=0,2		p=0,6		p=0,6		p=0,085		p=0,4		p=0,043		p=0,028		p=0,6	

Tabla 3.5: Relación entre el MOI y los alelos de resistencia en toda la muestra. S: alelo salvaje; M: alelo mutado.

Puesto que se observó un incremento del MOI en el segundo grupo con respecto al primero, analizamos la relación entre la presencia o ausencia de mutaciones de resistencia con el MOI en los dos grupos por separado, para saber si la asociación entre el MOI y los alelos salvajes o mutados estaba relacionada con dicho aumento del MOI. En el primer grupo, excepto en el caso del alelo *pfdhps-436*, la relación entre las mutaciones de resistencia y alelos salvajes o mutados no fue significativa en ningún caso (tabla 3.6). En el segundo grupo se observó un MOI más alto en relación con alelos mutados del gen *pfdhfr* y de los alelos *pfmdr1-86* y *pfcr1-76* y una relación entre MOI más alto y alelos en relación con alelos salvajes del gen *pfdhps*, *pfmdr1-1246*, aunque estas asociaciones no fueron significativas en todos los casos (tabla 3.7).

2002-2006																		
	<i>pfdhfr-51</i>		<i>pfdhfr-59</i>		<i>pfdhps-436</i>		<i>pfdhps-437</i>		<i>pfdhps-540</i>		<i>pfdhps-581</i>		<i>pfmdr1-86</i>		<i>pfmdr1.1246</i>		<i>pfcr1-76</i>	
Alelos	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M
MOI	1	1,90	1,67	1,90	1	1,3	1,65	1,99	1,90	1,68	1,84	2,50	1,68	2	1,92	1,75	3	1,86
	p=0,5		p=0,9		p=0,05		p=0,3		p=0,4		p=0,6		p=0,2		p=0,6		p=0,3	

Tabla 3.6.- Relación entre el MOI y los alelos de resistencia en el primer periodo de estudio.

S: alelo salvaje; M: alelo mutado.

2008-2010																		
	<i>pfdhfr-51</i>		<i>pfdhfr-59</i>		<i>pfdhps-436</i>		<i>pfdhps-437</i>		<i>pfdhps-540</i>		<i>pfdhps-581</i>		<i>pfmdr1-86</i>		<i>Pfmdr1.1246</i>		<i>pfcr1-76</i>	
Alelos	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M
MOI	1,50	3,56	1,0	3,53	3,46	*	4,86	3,18	3,74	2,14	3,50	3,0	2,71	4,32	3,50	2	2	3,50
	p=0,1		p=0,09		p=0,02		p=0,03		p=0,7		p=0,007		p=0,5		p=0,5			

Tabla 3.7.- Relación entre el MOI y los alelos de resistencia en el segundo periodo de estudio.

S: alelo salvaje; M: alelo mutado.

Relación entre el MOI y la inmunidad de los pacientes: no se observó en la muestra ninguna relación entre el MOI y el índice de inmunidad (y por tanto con la edad); No se encontraron diferencias en el MOI entre las estaciones seca y lluviosa.

4. Discusión

En las intervenciones para el control de la malaria, es fundamental la caracterización de las poblaciones de parásitos circulantes en un área determinada, antes de realizar cualquier tipo de actividad y después, para evaluar el impacto de dicha intervención tanto en la diversidad genética como en la multiplicidad de la infección. Estas evaluaciones del impacto se deben hacer tanto para el hospedador humano como en el mosquito.

Muchos estudios de variabilidad genética realizados en *P. falciparum* se han centrado en el análisis de variabilidad de proteínas antigénicas y en los genes que las codifican. La variabilidad del parásito, está causada por procesos de mutación, como inserciones y deleciones de nucleótidos, que se traducen finalmente en proteínas, variables de unas poblaciones a otras. Sobre dichas mutaciones actúa la selección natural y prueba el éxito de cada una de ellas. (Mackinnon y col., 2010). El parásito también presenta una serie de mutaciones puntuales en diversos genes que le confieren resistencia a antimaláricos. La selección natural actúa a favor de cepas salvajes, por una pérdida de la adaptabilidad biológica de las cepas resistentes (Babiker, 2009).

En Guinea Ecuatorial, tras la realización de un estudio *in vivo* de eficacia terapéutica de AS+AQ, se introdujo este antimalárico como primera línea de tratamiento en el año 2008. En las muestras estudiadas podemos observar que existe un aumento del MOI en las recogidas después del cambio de tratamiento (2008-2010) con respecto al periodo anterior (2002-2006), en el que la primera línea de tratamiento era SP; además existe un aumento de cada una de las tres familias alélicas estudiadas, *msh1*-K1, *msh1*-MAD20 y *msh1*-RO33. En el análisis de los factores que pueden influir en el MOI, como son la estacionalidad de las lluvias o la inmunidad (Omosum y col., 2005), no encontramos ninguna asociación significativa que explique este aumento.

Aunque el impacto por el descenso del uso de SP en el continente africano no ha sido evaluado todavía (OMS 2010), si las mutaciones no están fijadas, el menor uso de esta combinación debe llevar a un descenso en la prevalencia de mutaciones asociadas a dicha combinación. En el momento del cambio de SP a las terapias de ACTs (“Artemisinin-Based Combination Therapies”) en África estaba muy extendida la triple mutación *pfdhfr*-51I-59R-108N junto con la doble *pfdhps*-437G-540E. Esta asociación, denominada “quintuple mutación” es considerada un marcador molecular de fallo terapéutico con SP (Bwijo y col., 2003). La mutación clave en el gen *pfdhfr* es la S108N y en el gen *pfdhps* la A437G y las dos están bien establecidas en África, aunque con

variaciones geográficas en el continente (Mockenhaupt y col., 2005). En la prevalencia de las mutaciones de resistencia en nuestra muestra, observamos que las mutaciones bien establecidas en África, en el gen *pfdhfr*, no cambian en los dos grupos, manteniéndose en una prevalencia superior al 90%, excepto la mutación *pfdhfr*-164L, raramente descrita en todo el continente (Hyde, 2008). De la misma forma, la mutación *pfdhps*-437G muestra una tendencia a aumentar en el segundo periodo de tiempo. Observamos, sin embargo, un descenso significativo en la prevalencia de la mutación *pfdhps*-540E, que podría ser interpretada como una respuesta al descenso en el uso de SP.

Los valores de MOI más alto en el segundo grupo, están relacionados con la presencia de alelos salvajes del gen *pfdhps*, siendo estadísticamente significativo en el caso de los alelos salvajes *pfdhps*-A437 y *pfdhps*-K540. Esta asociación podría reflejar un primer escalón en el retroceso de la prevalencia de mutaciones de resistencia de este gen. Las cepas salvajes, cepas con mayor “fitness”, son transmitidas de forma más efectiva, lo que produce un incremento en el número del MOI. Es decir, el hecho de no utilizar como tratamiento de primera intención SP hace que, como consecuencia de un aumento de las cepas salvajes, el MOI aumente.

Este estudio presenta una potencia estadística baja, por lo que los resultados deben ser interpretados con cautela. Además, hay que considerar que la evaluación del MOI está limitada, porque fragmentos del mismo tamaño no corresponden siempre a la misma secuencia de gen (Kang y col., 2010). Por última, las parasitemias de los pacientes de nuestra muestra son muy bajas, lo que puede influir en la estimación del MOI (Kiwanuka y col., 2009; Ghanchi y col., 2010). Sin embargo, en los dos grupos estudiados no encontramos diferencia en las parasitemias, ni una relación de ésta con el MOI.

En la lucha contra la malaria es fundamental la cura radical de un episodio de malaria, definida como la eliminación de todas las formas sexuales y asexuales del parásito en el paciente, con el fin de bloquear la transmisión del parásito (Gosling y col., 2011). En el marco de esta lucha, es primordial conocer la dinámica de las poblaciones del parásito y la estructura de dichas poblaciones, así como identificar las circunstancias que influyen en los patrones de transmisión y provocan cambios en la diversidad antigénica del parásito. En esta línea, cualquier factor que produzca un aumento del MOI, debe ser aclarado, puesto que un incremento del MOI puede suponer un obstáculo en el desarrollo de vacunas, ya que conlleva un aumento de poblaciones genéticamente distintas transmitiéndose.

En este trabajo sólo podemos evaluar el impacto del cambio de tratamiento en la diversidad genética y en la prevalencia de mutaciones de resistencia de *P. falciparum*. En Guinea Ecuatorial se han realizado distintas intervenciones coincidiendo con los años en los que se recogieron las muestras del estudio, como el uso de mosquiteras impregnadas extendido a toda la población y fumigaciones intradomiciliarias, además del cambio en el protocolo de tratamiento, cuyo impacto

ha sido heterogéneo (Kleinschmidt y col., 2006; 2007; 2009). Según datos recogidos en el programa Roll Back Malaria, el plan de rociamientos intradomiciliarios con piretroides sintéticos en Guinea Ecuatorial puesto en marcha en 2004, había llegado en el 2010 a una cobertura total de la población del 70% y el uso de mosquiteras impregnadas era en 2010 del 87% (<http://www.rbm.who.int/>). Si estas intervenciones hubieran sido eficaces, la transmisión de la malaria debería haber disminuido, por lo que lo esperable sería un MOI más bajo. Paradójicamente, estas intervenciones parecen haber producido con el tiempo un descenso en la inmunidad de los adultos frente a malaria, lo que actualmente se está traduciendo con un aumento de las infecciones con clínica en adultos (Ministerio de Salud y bienestar Social de Guinea Ecuatorial, Plan Nacional de Lucha contra el Paludismo, comunicación personal), lo que finalmente podría producir un aumento de la transmisión y por tanto un MOI más alto (Londono-Renteria y col., 2011). Deberá esclarecerse si en el aumento del MOI en el segundo grupo han influido por estas intervenciones.

5. Conclusiones

- En el control de la transmisión de la malaria, la vigilancia y monitorización tanto de la diversidad genética como de la prevalencia de resistencias, así como el estudio de la asociación que pueda existir entre ambas, son imprescindibles.
- Algunos datos de nuestro trabajo indican que un descenso en la prevalencia de cepas resistentes en una zona determinada puede asociarse a un aumento del MOI.
- La disminución de la prevalencia de las resistencias, en relación con los cambios de los protocolos de tratamiento, podría asociarse a un aumento en el MOI al producir un aumento de las cepas salvajes, cepas con mayor adaptabilidad biológica. Por tanto el MOI puede ser un marcador de eficacia en la cobertura alcanzada en la población de un tratamiento dado.
- Sería interesante realizar estudios de secuenciación y/o análisis de microsatélites, que permitieran conocer las diferencias entre fragmentos de *pfmsp1* y hacer estudios de la evolución de *P. falciparum*.

Discusión General

En el pasado siglo, tras el fracaso del programa auspiciado por la OMS (“Global Malaria Eradication Program”, GMEP 1955-1969), (WHO, 1955; WHO, 1969), asistimos al hecho alarmante de que la malaria no sólo no estaba controlada, sino que en muchos lugares había aumentado su incidencia e incluso reaparecido en otros, donde se creía erradicada. Ya entonces los expertos reconocieron la importancia de los sistemas de vigilancia epidemiológica y alerta, así como de la necesidad de impulsar la investigación para el desarrollo de nuevas armas en la lucha contra la malaria, ante la progresión de la resistencia a antimaláricos e insecticidas (Krogstad, 1996).

Las medidas de control de malaria han aumentado en la última década (Steketee y col., 2010; O'Meara y col., 2010). Los informes publicados en enero de 2011 arrojan datos alentadores en la incidencia de la infección, con una reducción del 20% en la mortalidad producida por la infección con respecto a años anteriores (WHO 2010). Esto ha hecho que en el ambiente generalizado en la lucha por el control y la eliminación de la malaria sea de gran optimismo. Sin embargo, es evidente para los expertos que la eliminación, con los medios de que se dispone actualmente, no es posible (Roberts y col., 2007; Alonso y col., 2011). En el desarrollo de vacunas y de fármacos el estudio de la evolución del *P. falciparum* y de los factores que puedan influir en ella es esencial (***“Nothing in biology makes sense except in the light of evolution”*** T. Dobzhansky 1973. *Am Biol. Teach*, 35, 125-129).

En el marco de la lucha para el control de la malaria, el tratamiento para la eliminación efectiva del parásito tiene importancia no sólo para disminuir la morbimortalidad de un paciente con malaria clínica, sino también porque eliminando cualquier fase del parásito en el hombre, en especial los gametocitos, se reducen las posibilidades de perpetuar el ciclo de la malaria, aunque actualmente no se plantea el tratamiento de los adultos asintomáticos, que actuarían como reservorios del parásito (Bousema y col., 2011). Un factor relevante en los intentos de eliminación de la malaria es el hecho de que chimpancés y gorilas en África mantienen algunas de las especies de plasmodios que afectan al hombre (Krief y col., 2010, Duvala y col, 2010). Por ello, la obtención de una vacuna eficaz parece la alternativa más prometedora en la eliminación de la malaria.

Los distintos tratamientos empleados para la malaria han ido variando a lo largo de los últimos 60 años, desde que comenzó el uso de la cloroquina, en los años 50, debido a la pérdida de eficacia de los sucesivos tratamientos empleados, por el desarrollo de resistencias, la consecuente selección de cepas resistentes. Tras la introducción de las ACTs como tratamiento para la malaria no complicada no existen alternativas a las pautas empleadas en el momento actual. Por ello los estudios de vigilancia epidemiológica de las resistencias a antipalúdicos son un aspecto fundamental en el control de la malaria.

La resistencia a antimaláricos se relaciona con mutaciones puntuales que aparecen en el genoma del parásito. Estas mutaciones son espontáneas, pero la presión farmacológica es fundamental en su dispersión, porque selecciona cepas con mutaciones de resistencia. Muchos autores apoyan la idea de que una reducción en el uso de fármacos se asocia con una disminución en su resistencia. En algunas regiones se ha observado una reducción importante en la prevalencia de las cepas resistentes a cloroquina una vez que se ha suspendido o limitado su uso, lo que podría hacer pensar que es posible en un futuro volver a utilizar la cloroquina como tratamiento (Frosch y col., 2011).

Sin embargo, esta reducción en la prevalencia de cepas resistentes debe ser interpretada con cautela, ya que podría ser debida a una expansión de las cepas sensibles, pero se postula que la reintroducción del fármaco llevaría a una nueva y rápida reexpansión de las cepas resistentes, si han sobrevivido en la población (Laufer y col., 2010). Por el contrario la OMS recomienda no reintroducir su uso por el momento (WHO 2010).

Existen hasta la fecha pocos estudios de epidemiología molecular de resistencias y variabilidad genética hechos en muestras obtenidas en áreas no endémicas de malaria, como este trabajo, debido a la dificultad para extraer información de las muestras no seleccionadas con una metodología concreta, lo que hace que deban ser cuidadosamente clasificadas.

En este trabajo se han estudiado aislados de infecciones por *P.falciparum* diagnosticadas y tratadas en el hospital Carlos III de Madrid en pacientes que provenían de distintos países de África. Las muestras se recogieron a lo largo de ocho años durante la década en la que se ha producido el cambio a ACTs en el continente africano.

El objetivo del estudio ha sido conocer el impacto del cambio de tratamiento en distintas variables relacionadas con la infección y con la transmisión del parásito. Se ha analizado la prevalencia de marcadores asociados a resistencia a antimaláricos y su relación con tres aspectos diferentes:

- Cambios de la prevalencia de cepas salvajes y mutadas en relación con la presión farmacológica.
- Análisis de la relación entre la presencia de aislados salvajes o mutados en la presentación clínica de la infección. Papel del hombre como reservorio de las cepas resistentes.
- Análisis del impacto del cambio de tratamiento de la malaria no complicada, en el patrón de poblaciones del parásito, considerando la repercusión que esto puede tener en el diseño de vacunas.

Las muestras utilizadas en el trabajo son muestras clínicas, con las que no han sido seleccionadas con criterios planteados a priori, como se hace en estudios llevados a cabo en el terreno, en relación a la edad de los pacientes, o la densidad parasitaria de las infecciones. Esto hace que en el análisis

haya planteado ciertas dificultades. Por ello, la clasificación previa de los datos antes de realizar cualquier análisis ha sido meticulosa, y de la siguiente manera:

- Las muestras obtenidas son de regiones de África muy diferentes, en las que existen distinta intensidad de transmisión y distintas pautas de tratamiento. Además los patrones de expansión de las resistencias a antimaláricos tienen también una marcada distribución geográfica. Para intentar homogeneizar los datos, se han analizando los resultados en función de las regiones geográficas en las que la OMS agrupa los países de África.
- En el resultado de la efectividad de un antimalárico es fundamental el papel de la inmunidad adquirida. En los pacientes con inmunidad frente a la malaria el tratamiento produce un descenso importante de la parasitemia pero, en general, queda un remanente de parásitos que son aclarados por la inmunidad. En lo relativo a la inmunidad adquirida frente a la malaria, los pacientes incluidos en nuestro trabajo tienen distintos niveles de anticuerpos adquiridos frente a la enfermedad, lo que hace que sea difícil hacer un análisis equilibrado. Para ello hemos clasificado a los pacientes considerando los dos factores que influyen en la adquisición de dicha inmunidad, que son la exposición continuada y permanente a infecciones por *P. falciparum* y el tiempo de dicha exposición, es decir, la edad. Con ello se ha conseguido una clasificación coherente de los pacientes.
- La parasitemia de los pacientes vistos en el hospital es, salvo alguna excepción, muy baja. Este dato limita los análisis, fundamentalmente en lo relativo a la variabilidad genética. Es probable que el valor del MOI en relación con esta parasitemia sea más bajo del real. En estos pacientes no es posible hacer seguimiento del MOI, porque la PCR se negativiza rápidamente tras la administración de la primera dosis de tratamiento. Sin embargo, esta limitación es común a todos las muestras (>80% de los pacientes vistos tenían una parasitemia inferior al 0,1%), por lo que no resta homogeneidad al estudio.
- Las infecciones mixtas, con presencia de poblaciones de parásitos salvajes y mutados en los alelos relacionados con la resistencia, se han interpretado como poblaciones de parásitos mutados en la línea de otros estudios publicados. Esto puede suponer una pobre estimación de las cepas con mutaciones de resistencia (Hastings y col., 2008).
- Para el análisis de variabilidad genética se han utilizado sólo pacientes procedentes de Guinea Ecuatorial, para delimitar un entorno geográfico y un área de endemicidad específica. En este caso conocemos datos relacionados con el cambio

de tratamiento pero no tenemos posibilidad de valorar otras medidas de control que se han implantado en este país.

Aunque la clasificación de los pacientes ha sido minuciosa, la interpretación de los datos debe ser prudente en algunos casos, por la poca potencia estadística de algunos de ellos.

En el capítulo I del trabajo se analiza la prevalencia de alelos salvajes y mutados en los aislados. La identificación en personas infectadas con *P. falciparum* de marcadores moleculares asociados a resistencia a fármacos permite deducir la posible eficacia de los tratamientos de la malaria (Plowe, 2003). Además, son fundamentales como sistema de alerta epidemiológica, por una parte para la detección de marcadores de resistencia que puedan poner en peligro la eficacia de las ACTs y por otra, para la detección de los marcadores relacionados con resistencia a SP, empleada en IPT. El éxito de las ACTs y del TPI en África va a depender de la capacidad de anticipar su aparición y su propagación, lo que permitirá una respuesta más rápida. La vigilancia de las mutaciones de resistencia relacionadas con fármacos que ya no se utilizan o cuyo uso ha quedado limitado debe continuar, en espera de que se llegue a una conclusión con respecto al significado de los cambios en su prevalencia. Por último, el análisis de mutaciones asociadas a resistencia podría ser utilizado como un indicador de si el uso de fármacos se está realizando siguiendo las recomendaciones en las políticas de tratamiento oficial (Mita y col., 2009).

En nuestro estudio la distribución de los aislados de *P. falciparum* en las tres regiones de África es desigual, ya que la mayor parte provienen de África Central (79,9%), una menor proporción de África Occidental (16,1%) y la representación de África Oriental es muy escasa (4%), por lo que no existe significación estadística de los resultados de la segunda región y no es posible extraer muchas conclusiones de la tercera.

En la prevalencia de las mutaciones asociadas a SP, los datos expuestos en el trabajo, reflejan, una parte las diferencias ampliamente publicadas en otros trabajos en la frecuencia de la triple mutación *pf dhfr*, considerablemente extendida en África, y la doble mutación *pf dhps*, mucho menos prevalente. Las últimas revisiones que hemos realizado indican que la prevalencia de la triple mutación en el gen *pf dhfr* junto con la doble mutación en el *pf dhps* aumentan continuamente en África (Sridaran y col., 2010). Sin embargo, los aislados procedentes de África Central y Occidental muestran 2 tendencias diferentes: 1) la prevalencia de mutaciones parece estabilizarse o disminuir en África Central y 2) en África Occidental aumenta.

Es de destacar en concreto, que los resultados de nuestro trabajo relativos a la mutación 540E pueden reflejar un punto de inflexión en la evolución de la dispersión de mutaciones asociadas a resistencia a la combinación SP en África. En nuestros resultados observamos un descenso en la mutación 540E en África central. Si tomamos como referencia una de las últimas revisiones publicadas en relación con la presencia de esta mutación en África por Naidoo y col. en 2010, en

ella se describe un aumento gradual y una propagación hacia occidente en su prevalencia. Los datos de nuestro trabajo referentes a África Central reflejan un cambio en esta tendencia. En la revisión mencionada anteriormente (Naidoo y col., 2010), en Guinea Ecuatorial aparece libre de la mutación hasta 2005; en nuestros aislados aparece la mutación en el periodo 2002-2006, aunque descende en el segundo periodo (2008-2010). Hasta la fecha, que conozcamos, no existe ningún trabajo en aislados de África que haya evaluado y refleje este cambio de prevalencia en África tras la instauración de las ACTs y que es clave en el éxito de las IPTs (WHO2010).

Sin embargo la aparición de la mutación 581G en Camerún, Gabón y Guinea Ecuatorial, donde no ha sido descrita hasta la fecha, (<http://www.drugresistancemaps.org/maps/dhps581/>), es un dato de alarma que debe evaluarse, ya que además de su papel de marcador de alta resistencia a SP ha sido demostrada una selección de esta mutación en mujeres que reciben IPT (Harrington y col., 2009).

En cuanto a marcadores moleculares de resistencia relacionados con los antimaláricos usados actualmente en África (*pfprt* y *pfmdr1*), se ha observado un descenso en la prevalencia de las mutaciones *pfprt*-76T y *pfmdr1*-86Y en respuesta a la disminución en el uso de cloroquina en algunas regiones (Frosch y col., 2011). Con respecto a estos marcadores, hay que destacar que en varios trabajos publicados este aumento de las cepas salvajes se considera actualmente un primer escalón en la resistencia a las ATCs, ya que se ha observado un aumento de reinfecciones por estas cepas, lo que hace aconsejar el uso de lumefantrina en áreas donde las mutaciones de resistencia a la cloroquina permanecen altas (WHO 2011). En las tres regiones estudiadas en nuestro trabajo la prevalencia del alelo mutado *pfprt*-K76 se sitúa por encima del 95% al final del estudio, sin embargo, la prevalencia de los alelos salvajes del gen *pfmdr1* aumenta gradualmente:

- *pfmdr1* N86 alcanza una prevalencia superior al 50% en África Central y al 70% en África Occidental
- *pfmdr1* D1246 es superior al 90% en África Central y al 70% en África Occidental.

A la vista de estos resultados, considerando que el análisis está realizado en la transición a la implantación de las ACTs, determinar si este aumento en los alelos salvajes es el resultado de la presión selectiva de los tratamientos con ACTs, es esencial.

Cuando la resistencia se expande, el tratamiento deja de ser eficaz. En un primer momento este hecho no es clínicamente evidente, pero con la expansión de la resistencia aumentan los casos de fracaso terapéutico, la clínica grave y las muertes por malaria. Sin embargo, en las cepas resistentes se producen cambios en microsatélites próximos a las mutaciones asociadas a resistencia, para conservar la ventaja selectiva que les proporciona la mutación, lo que según algunos estudios condiciona una desventaja para estas cepas, al restringir su variabilidad, limitando su capacidad para evadir el sistema inmune (Babiker y col., 2009). Esta desventaja actuaría cuando cesa la presión farmacológica (Ord y col., 2007)

Distintos estudios han relacionado la presencia de mutaciones de resistencia con una clínica más grave, otros encuentran la relación opuesta y otros no encuentran ninguna relación. Estos estudios están hechos en general con respecto a marcadores relacionados con la resistencia cloroquina (*pfcr1* y *pfmdr1*) (Merman y col., 2005).

En este trabajo hemos realizado primero una descripción de la clínica presentada por los pacientes estudiados. Para evaluar la severidad de la infección, se clasificaron los pacientes en base a la inmunidad adquirida frente a la malaria, considerando su exposición al parásito.

Posteriormente analizamos si la presentación de la infección, y en concreto en las dos formas más habituales de malaria grave, la anemia grave y la malaria cerebral, estaban relacionadas con la presencia de cepas salvajes o mutadas en locus asociados a resistencia a antimaláricos. Como un pequeño porcentaje de pacientes fue asintomático, realizamos un análisis de la relación entre la presencia o ausencia de mutaciones de resistencia en la sintomatología por una parte y los parámetros analíticos por otra, para luego hacer un estudio de lo que denominamos perfil de la infección, considerando la clínica y la analítica en su conjunto.

La presentación más frecuente en nuestros pacientes fue la de un cuadro de malaria no complicada, tanto en los pacientes inmunes como en los pacientes no inmunes. El comportamiento de la infección en estos pacientes es el esperable, es decir, los cuadros más severos se producen en pacientes no inmunes, aunque los niveles de hemoglobina son significativamente más bajos en los pacientes inmunes, algo habitual en estos pacientes, en los que existe generalmente un alto porcentaje de infecciones, fundamentalmente gastrointestinales, que hacen que en ellos sea frecuentes la anemia crónica.

Con los resultados obtenidos, podemos observar que en general una presentación clínica más grave se asocia a la presencia de cepas salvajes. Sin embargo la presencia del alelo mutado 581G en el gen *pfdhps* se asocia a una presentación más grave. El impacto de esta mutación es difícil de establecer, dado su escasa presencia en África. El hecho de que sea de aparición muy reciente en África central, donde detectamos los casos en la muestra, puede hacer se asocie con una presentación clínica más grave. Sin embargo, en relación al resto de mutaciones de resistencia estudiadas, las cepas mutadas podrían asociarse a infecciones menos graves, que favorecen por un lado al establecimiento de reservorios y por otro en un aumento de infecciones con un retraso en el diagnóstico, hecho que podría propiciar a la larga la aparición de infecciones más graves.

Si consideramos los datos de las muestras procedentes de África central recogidos en la primera parte del trabajo, la prevalencia de las mutaciones de resistencia asociadas al uso de SP podría estar disminuyendo en algunas regiones. Si la prevalencia de las cepas resistentes a SP está disminuyendo en ausencia de presión farmacológica, el hecho de que las infecciones por estas

cepas puedan ser más agresivas facilita que su diagnóstico sea más temprano y su tratamiento deberá ser más eficaz.

Los resultados en los alelos asociados a resistencia a cloroquina y relacionados con amodiaquina y lumefantrina (*pfcr1*, *pfmdr1*), los dos componentes de las ACTs empleados en África, sin embargo, merecen otra consideración. Las ACTs se han relacionado con un aumento de reinfecciones por cepas salvajes en estos marcadores. El hecho de que la malaria en presencia de cepas salvajes para estos marcadores fuera más grave, podría suponer un peligro adicional para el éxito de las ACTs. La prevalencia del 95% de la mutación *pfcr1*-76T en la muestra sin embargo, respalda el éxito del tratamiento actualmente, aunque la rapidez en la aparición de algunas resistencias a lo largo de la historia de los antimaláricos hace que la vigilancia deba ser constante. Sin embargo, la presencia de infecciones significativamente más graves del alelo mutado *pfmdr1*-1246 hace que la vigilancia de la aparición de cepas salvajes en relación con las ACTs deba ser estrecha, por la posibilidad de infradiagnosticar estas infecciones y su implicación en la expansión de resistencia a estas combinaciones.

A pesar de la limitación en los resultados, no conocemos un trabajo en el que se hayan analizado once marcadores moleculares asociados a resistencia. Los datos obtenidos en este trabajo pueden contribuir a que se diseñen estudios en los que la valoración de la severidad de la clínica asociada a mutaciones de resistencia sea más consistente.

En la prevalencia de las mutaciones asociadas a resistencia además de la presión farmacológica influyen otros factores, como es la intensidad de la transmisión, la cual también influye en la variabilidad genética del parásito (Mayengue y col., 2011). Antes y después de cualquier medida de control, como son el cambio en los tratamientos, los rociamientos intradomiciliarios o el uso de mosquiteras impregnadas, el conocimiento de la variabilidad genética en las poblaciones circulantes de *P. falciparum* es esencial, para valorar el impacto de dichas medidas.

Hemos analizado la relación entre las poblaciones de *P. falciparum* presentes en los aislados procedentes de Guinea Ecuatorial durante 8 años, teniendo en cuenta el cambio de tratamiento que se produjo en el año 2008. Coincidiendo con ese cambio de tratamiento se han llevado a cabo, fundamentalmente en la región insular del país, medidas encaminadas al control vectorial. Los últimos datos del impacto directo de estas medidas son de 2009, en los que se reflejan un descenso importante en la isla de Bioko de la incidencia de la infección (Kleinschmidt y col., 2009).

El análisis de la variabilidad genética del parásito se ha hecho con el gen *pfmsp1*, que codifica la proteína más abundante de la superficie del merozoíto, MSP1. Esta proteína ha sido ampliamente estudiada, por su posible papel en la invasión de los glóbulos rojos, en ensayos para el desarrollo de una vacuna. La variabilidad del gen que codifica esta proteína se puede realizar mediante el estudio

de las familias alélicas en las que se encuentra dividido dicho gen. En este trabajo hemos analizado tres de ellas, *pfmsp1*-K1, *pfmsp1*-MAD20 y *pfmsp1*-RO33.

Para valorar el impacto del cambio de tratamiento en la variabilidad genética se compara el análisis de las muestras de antes de la introducción ese tratamiento, grupo del 2002-2006, con las muestras del grupo de después de la introducción del tratamiento, muestras del 2008-2010. Consideramos en el análisis factores que influyen en la variabilidad genética, como son la estación seca o lluviosa así como la inmunidad del paciente.

En el segundo grupo de pacientes (2006-2008) observamos un aumento significativo de la variabilidad genética, considerando las tres familias alélicas estudiadas y la multiplicidad de la infección o MOI. La disminución de la prevalencia de las resistencias parece asociarse a este aumento del MOI, lo que hace que este índice pueda ser un marcador de la cobertura alcanzada en la población del cambio de tratamiento. El hecho de que los cambios en la prevalencia de las mutaciones de resistencia puedan influir en la variabilidad genética del parásito es un factor que deberá ser tenido en cuenta en el desarrollo de vacunas.

Sin embargo, sería necesaria una evaluación conjunta de otras medidas de control que se han implantado en el país, fundamentalmente de control vectorial, para poder valorar estos resultados. Estas medidas de control vectorial han hecho que en algunas zonas se produzca un aumento de los casos de malaria clínica en adultos.

España como país receptor no es un país en riesgo de reintroducción de la malaria, por la ausencia de vector eficaz, aunque mantenemos el que actuaba como tal antes de la erradicación de malaria en España. Sin embargo, en los últimos años son continuos los informes que alertan de esta posibilidad, relacionados fundamentalmente con el cambio climático, las migraciones de especies de aves y el aumento de viajes internacionales. Se ha descrito un caso de probable malaria importada en el último año por *P. vivax* en nuestro país (Rubio y col. comunicación a congreso). En Grecia, en los últimos 3 años, se ha detectado un brote de 61 casos de malaria por *P. vivax*, con transmisión autóctona. El volumen de viajes internacionales también ha aumentado en el continente africano en los últimos años y con él el riesgo de dispersión de infecciones y por tanto de las resistencias a los tratamientos. Todos los desplazamientos humanos que se producen cada vez de forma más frecuente entre zonas endémicas de malaria, así como de zonas endémicas a zonas libres de malaria, pueden provocar un cambio en la epidemiología de la infección, introduciendo nuevas cepas de resistencia, o incluso llevando la infección a zonas donde ya se había erradicado.

Aunque los niveles de resistencia a nivel local son modulados por el uso de fármacos en ese lugar concreto, desde hace tiempo está bien establecido el papel de los movimientos humanos en la dispersión de las resistencias y en concreto es sabido que algunas localizaciones geográficas pueden ser determinantes en la expansión de las mismas. Desde hace tiempo se sabe que las

poblaciones de parásitos están unidas a redes de circulación de personas. Una vez establecida una mutación en un lugar, su dispersión puede ser muy rápida. En algunos trabajos relacionados con el control de la malaria, se indica que la circulación de población entre las islas de África y el continente es menos frecuente que los desplazamientos en el continente, por lo que la dispersión y el intercambio de resistencias son poco habituales en las zonas insulares, actuando las islas como nichos cerrados para las poblaciones de *Plasmodium* spp y por tanto se supone un más fácil control de la infección. Sin embargo, en Guinea Ecuatorial la circulación en el continente entre los países fronterizos (Gabón y Camerún) es constante, y la isla de Bioko además es una excepción al patrón antes mencionado, ya que en ella se encuentra la capital del país, por tanto el lugar de donde sale mucha población por vía aérea a otras zonas del país y a otros países de África. Existen trabajos en los que se habla específicamente de esta isla por la importancia que tuvo no sólo en la dispersión sino también en el origen de mutaciones de resistencia de asociadas a cloroquina. La isla de Annobon, también en Guinea Ecuatorial, si sería un ejemplo de nicho cerrado de poblaciones de *Plasmodium* spp, debido a la escasa circulación de poblaciones humanas con otras zonas del país así como con otros países, lo que facilitaría aplicar en esta isla métodos de control y eliminación de la malaria (Cano y col., 2007).

La presencia de la mutación 581G en el gen *pf dhps* en aislados de nuestro estudio de Guinea, Gabón y Camerún, países en los que no se ha notificado dicha mutación hasta el momento, hace a la isla de Bioko un posible foco de dispersión de dicha mutación, lo que merece un especial seguimiento para evitarlo. La vigilancia de cepas emergentes con mutaciones asociadas a multirresistencia puede proteger el tratamiento de la malaria en los años venideros, pero quizás esto sólo se puede hacer sin perder de vista la “migración geográfica” asociada a la malaria.

Este trabajo puede sentar las bases para análisis posteriores más completos. La utilización de aislados de pacientes en países no endémicos puede contribuir al estudio y la caracterización de la epidemiología molecular de la malaria.

El análisis que hemos realizado con muestras recogidas a lo largo de 8 años, refleja la evolución de las resistencias así como del impacto del cambio de tratamiento, de SP a ACTs en África. Hemos aportado datos que pueden contribuir a valorar el impacto que está teniendo el tratamiento con ACTs en África.

Este trabajo ha planteado las bases para la realización de un estudio más profundo con las muestras de las que España es receptora, usando técnicas de biología molecular como la secuenciación, o el análisis de microsatélites que podrían contribuir a un estudio más profundo en los factores que influyen en la dinámica de la estructura de las poblaciones del parásito y en la dispersión de las resistencias.

Conclusiones generales

1. Tras la incorporación de las Terapias Combinadas con Artemisininas (ACTs) como primera línea de tratamiento, en la mayoría de los países africanos, existe un aumento de alelos salvajes en genes relacionados con la resistencia a estas combinaciones, este aumento es considerado el primer escalón para aparición de las resistencias a estas combinaciones.
2. Se detecta por primera vez una disminución de los alelos mutados relacionados con resistencia a SP, tras el cese de su uso como tratamiento de primera intención en África.
3. En general, los aislados que presentan mutaciones en genes de resistencia se asocian a una infección menos sintomática, lo que podría llevar a un retraso en el diagnóstico, y favorecer a la aparición de infecciones con mayor morbilidad a largo plazo y de reservorios de parásitos resistentes.
4. Las infecciones en las que aparecen mutaciones de alta resistencia, como la mutación *pfdhps* 581G, que son poco frecuentes en las poblaciones de *P. falciparum* de África, se asocian a una clínica más severa.
5. La presencia del alelo salvaje *pfmdr1*-1246 se asocia a infecciones significativamente más leves, lo que deberá ser evaluado en relación con las ACTs.
6. Los parásitos responden a las medidas de control de malaria mediante cambios compensatorios que les permiten aumentar su supervivencia. Los cambios en el tratamiento pueden producir cambios en la variabilidad genética del parásito que deben ser considerados porque pueden afectar al diseño de vacunas.
7. Se observa una disminución de la prevalencia de las mutaciones en los genes implicados en la resistencia a sulfadoxina/ pirimetamina, que parece estar asociada a los cambios de los protocolos de tratamiento, y a un aumento del índice MOI. Este índice podría ser un indicador del alcance que está teniendo la cobertura del nuevo tratamiento, sobre todo en los momentos iniciales del cambio de protocolo.

8. Los datos obtenidos de aislados de pacientes diagnosticados en un laboratorio de microbiología asistencial son útiles en el estudio de marcadores moleculares relacionados con la resistencia a antimaláricos, por su aportación a la vigilancia epidemiología de las resistencias a antimaláricos, así como por el estudio de su relación con distintos parámetros clínicos y epidemiológicos implicados en el control de la infección.

Bibliografía

1. Abdulla S, (The malERA Consultative Group on Vaccines) Agre P, Alonso PL, Arevalo-Herrera M, Bassat Q, Binka F, Chitnis C, Corradin G, Cowman A, Culpepper J, del Portillo H, Dinglasan R, Duffy P, Gargallo D, Greenwood B, Guinovart C, Hall BF, Herrera S, Hoffman S, Lanzavecchia A, Leroy O, Levine MM, Loucq C, Mendis K, Milman J, Moorthy V, Pleuschke G, Plowe CV, Reed S, Sauerwein R, Saul A, Schofield L, Sinden R, Stubbs J, Villafana T, Wirth D, Yadav P, Ballou R, Brown G, Birkett A, Brandt W, Brooks A, Carter T, Golden A, Lee C, Nunes J, Puijalón O, Raphael T, Richards H, Warren C, Woods C: **A research agenda for malaria eradication: vaccines.** *PLoS Med* 2011, **8(1)**:e1000398.
2. Ahorlu CK, Koram KA, Seake-Kuawu A, Weiss Mg: **Two-year evaluation of intermittent preventive treatment for children (IPTc) combined with timely home treatment for malaria control in Ghana.** *Malar J* 2011, **10**:127.
3. Ahmed A, Das MK, Dev V, Saifi MA, Wajihullah, Sharma YD: **Quadruple mutations in Dihydrofolate Reductase of *Plasmodium falciparum* isolates from Car Nicobar Island, India.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50(4)**:1546-1549.
4. Alker AP, Lim P, Sem R, Shah NK, Yi P, Bouth DM, Tsuyuoka R, Maguire JD, Fandeur T, Arieu F, Wongsrichanalai C, Meshnick SR: ***Pfmdr1* and *in vivo* resistance to artesunate-mefloquine in *falciparum* malaria on the Cambodian-Thai border.** *Am J Trop Med Hyg* 2007, **76(4)**:641-647.
5. Alonso PL, Brown G, Arevalo-Herrera M, Binka F, Chitnis C, Collins F, Doumbo OK, Greenwood B, Hall BF, Levine MM, Mendis K, Newman RD, Plowe CV, Rodríguez MH, Sinden R, Slutsker L, Tanner M: **A research agenda to underpin malaria eradication.** *PLoS Med* 2011, **8(1)**:e1000406.
6. Alonso PL, Bassat Q, Binka F, Brewer T, Chandra R, Culpepper J, Dinglasan R, Duncan K, Duparc S, Fukuda M, Laxminarayan R, MacArthur JR, Magill A, Marzetta C, Milman J, Mutabingwa T, Nosten F, Nwaka S, Nyunt M, Ohrt C, Plowe CV, Pottage J, Price R, Ringwald

- P, Serazin A, Shanks D, Sinden R, Tanner M, Vial H, Ward SA, Wellems TE, Wells T, White N, Wirth D, Yeung S, Yuthavong Y, Djimde A, Nájera J, Kremsner P, Mueller I, Newman RD, Rabinovich R: **malERA Consultative Group on Drugs: A research agenda for malaria eradication: drugs.** *PLoS Med* 2011, **8(1)**:e1000402.
7. Alvar J, Puente S, Blazquez J: **In vitro chloroquine-resistant falciparum malaria in Malabo, Equatorial Guinea: case reports.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 1987, **7(1)**:51-53.
 8. Al Yaman F, Genton B, Taraika J, Anders R, Alpers MP: **Cellular immunity to merozoite surface protein 2 (FC27 and 3D7) in Papua New Guinean children. Temporal variation and relation to clinical and parasitological status.** *Parasite Immunol* 1997, **19**:207-214.
 9. Anderson TJC, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, Bockarie M, Mokili J, Mharakurwa S, French N, Whitworth J, Velez ID, Brockman AH, Nosten F, Ferreira MU, Day KP: **Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.** *Mol Biol Evol* 2000, **17(10)**:1467-1482.
 10. Anong DN, Nkuo-Akenji T, Fru-Cho J, Amambua-Ngwa A, Titanji VPK: **Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in Bolifamba, on the slopes of Mount Cameroon: influence of MSP1 allelic variants on symptomatic malaria and anaemia.** *Ann Trop Med Parasitol* 2010, **104(1)**:25-33.
 11. Arnáez J, Roa MA, Albert L, Cogollos R, Rubio JM, Villares R, Alarabe A, Cervera A, López-Vélez R: **Imported malaria in children: a comparative study between recent immigrants and immigrant travelers (VFRs).** *J Travel Med* 2010, **17(4)**:221-227.
 12. Artzy-Randrup Y, Alonso D, Pascual M: **Transmission intensity and drug resistance in malaria population dynamics: implications for climate change.** *PLoS One* 2010, **5(10)**:e13588.

13. Babiker HA, Hastings IM, Swedberg G: **Impaired fitness of drug-resistant malaria parasites: evidence and implication on drug-deployment policies.** *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009, **7(5)**:581-593.
14. Babiker HA: **Seasonal fluctuation of drug resistant malaria: a sign of fitness cost.** *Trends Parasitol* 2009, **25(8)**:351-352.
15. Barnes KI, White NJ: **Population biology and antimalarial resistance: the transmission of antimalarial drug resistance in *Plasmodium falciparum*.** *Acta Trop* 2005, **94(3)**:230-240.
16. Bassat Q, Alonso PL: **Fathoming severe *Plasmodium vivax* disease.** *Nat Med* 2011, **17(1)**:48-49.
17. Bayoh MN, Akhwale W, Ombok M, Sang D, Engoki SC, Koros D, Walker ED, Williams HA, Burke H, Armstrong GL, Cetron MS, Weinberg M, Breiman R, Hamel MJ: **Malaria in Kakuma refugee camp, Turkana, Kenya: facilitation of *Anopheles arabiensis* vector populations by installed water distribution and catchment systems.** *Malar J.* 2011, **10**:149.
18. Beck HP, Felger I, Huber W, Steiger S, Smith T, Weiss N, Alonso P, Tanner M: **Analysis of multiple *Plasmodium falciparum* infections in Tanzanian children during the phase III trial of the malaria vaccine SPf66.** *J Infect Dis* 1997, **175**:921-926.
19. Beck HP: **How does molecular epidemiology help to understand malaria?** *Trop Med Int Health* 1999, **4**:1-3.
20. Beeson JG, Osier FHA, Engwerda CR: **Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria.** *Trends Parasitol* 2008, **24(12)**:578-584.
21. Benito A, Roche J, Molina R, Amela C, Alvar J: **In vitro susceptibility of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, amodiaquine, quinine, mefloquine and sulphadoxine/pyrimethamine in Equatorial Guinea.** *Am J Trop Med Hyg* 1995, **53(5)**:526-531.

-
22. Bertin G, Briand V, Bonaventure D, Carrieu A, Massougbodji A, Cot M, Deloron P: **Molecular markers of resistance to sulphadoxine-pyrimethamine during intermittent preventive treatment of pregnant women in Benin.** *Malar J* 2011, **10**:169.
23. Bloland P (World Health Organisation): **Drug resistance in malaria.** WHO/CDS/CSR/CDR/2001.4.
24. Bousema T, Drakeley C: **Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination.** *Clin Microbiol Rev* 2011, **24(2)**:377-410.
25. Bouyou-Akotet MK, Dzeing-Ella A, Kendjo E, Etoughe D, Ngoungou EB, Planche T, Koko J, Kombila M: **Impact of *Plasmodium falciparum* infection on the frequency of moderate to severe anaemia in children below 10 years of age in Gabon.** *Malar J* 2009, **20(8)**:166.
26. Brooker S, Hotez PJ, Bundy DAP: **Hookworm-Related Anaemia among Pregnant Women: A Systematic Review.** *PLos Neg Trop Dis* 2008, **2(9)**:e291.
27. Bruce-Chwatt LJ: **Chemotherapy of malaria.** Revised 2nd Ed. Geneva, World Health Organization, 1986.
28. Bruneel F, Tubach F, Corne P, Megarbane B, Mira JP, Peytel E, Camus C, Schortgen F, Azoulay E, Cohen Y, Georges H, Meybeck A, Hyvernât H, Trouillet JL, Frenoy E, Nicolet L, Roy C, Durand R, Le Bras J, Wolff M: **Severe imported falciparum malaria: A cohort study in 400 critically ill adults.** *PLos One* 2010, **5(10)**:e13236.
29. Bwijo B, Kaneko A, Takechi M, Zungu IL, Moriyama Y, Lum JK, Tsukahara T, Mita T, Takahashi N, Bergqvist Y, Björkman A, Kowayakawa T. **High prevalence of quintuple mutant *dhfr/dhps* genes in *Plasmodium falciparum* infections seven years after introduction of sulphadoxine and pyrimethamine as first line treatment in Malawi.** *Acta Trop* 2003, **85(3)**:363-373.

-
30. Cano J, Berzosa P, de Lucio A, Descalzo MA, Bobuakasi L, Nzambo S, Ondo M, Buatiche JN, Nseng G, Benito A: **Transmission of malaria and genotypic variability of *Plasmodium falciparum* on the island of Annobon (Equatorial Guinea).** *Malar J* 2007, **6**:141.
31. Carlton JM, AA Escalante, Neafsey D, Volkman SQ: **Comparative evolutionary genomics of human malaria parasites.** *Trends Parasitol* 2008, **24(12)**:545-550.
32. Carneiro I, Roca-Feltre A, Griffin JT, Smith L, Tanner M, Schellenberg JA, Greenwood B, Schellenberg D: **Age-patterns of malaria vary with severity, transmission intensity and seasonality in sub-Saharan Africa: a systematic review and pooled analysis.** *PLoS One* 2010, **5(2)**:e8988.
33. Carter R, Mendis KN: **Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria.** *Clin Microb Rev* 2002, **15(5)**:564-594.
34. Costanzo MS, Hartl DL **The evolutionary landscape of antifolate resistance in *Plasmodium falciparum*.** *J Gen* 2011, **90(2)**:187-190.
35. Cravo P, Culleton R, Hunt P, Walliker D, Mackinnon MJ: **Antimalarial drugs clear resistant parasites from partially immune hosts.** *Antimicrob Agents Chemother* 2001, **45(10)**:2897-2901.
36. Charle P, Berzosa P, Descalzo MA, Lucio A, Raso J, Obono J, Lwanga M, Nlang N, Nchama A, Mangue C, MichaA, Nsee N, Mesie R, Benito A, Roche J: **Efficacy of Artesunate + Sulphadoxine-Pyrimethamine (AS + SP) and Amodiaquine + Sulphadoxine-Pyrimethamine (AQ+ SP) for Uncomplicated falciparum Malaria in Equatorial Guinea (Central Africa).** *J Trop Med* 2009, doi:10.1155/2009/781865.
37. Dash AP, Valecha N, Anvikar AR, Kumar A: **Malaria in India: Challenges and opportunities.** *J. Biosci.* 2008, **33(4)**:583-592.
38. Davenport GC, Ouma C, Hittner JB, Were T, Ouma Y, Ong'echa JM, Perkins DJ: **Hematological predictors of increased severe anemia in Kenyan Children Co-infected with *Plasmodium falciparum* and HIV-1.** *Am J Hematol* 2010, **85(4)**:227-233.

-
39. Dent AE, Chelimo K, Sumba PO, Spring MD, Crabb BS, Moormann AM, Tisch DJ, Kazur JW: **Temporal stability of naturally acquired immunity to merozoite surface protein-1 in Kenian adults.** *Malar J* 2009, **8**:162.
40. Dias S, Somarathna M, Manamperi A, Escalante AA, Gunasekera AM, Udagama PV: **Evaluation of the genetic diversity of domain II of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (PvAMA1) and the ensuing strain-specific immune responses in patients from Sri Lanka.** *Vaccine* 2011, **29(43)**:7491-7504.
41. Dippmann AK, Bienzle U, Harms G, Mockenhaupt FP: ***pfmdr1* mutations in imported African *Plasmodium falciparum* isolates.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008, **102**:1148-1150.
42. Dokomajilar C, Nsoby SL, Greenhouse B, Rosenthal PJ, Dorsey G: **Selection of *Plasmodium falciparum pfmdr1* alleles following therapy with Artemether-Lumefantrine in an area of Uganda where malaria is highly endemic.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50(5)**:1893-1895.
43. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, Lwin KM, Ariey F, W Hanpithakpong F, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NPJ, Lindegardh N, Socheat D, White NJ: **Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria.** *N Engl J Med* 2009, **361**:455-467.
44. Doolan DL, Dobaño C, Baird JK: **Acquired immunity to malaria.** *Clin Microbiol Rev* 2009, **22(1)**:13-36.
45. Douglas NM, Anstey NM, Angus BJ, Nosten F, Price RN: **Artemisinin combination therapy for vivax malaria.** *Lancet Infect Dis* 2010, **10**:405-416.
46. Duvala L, Fourmentc M, Nerrienete E, Roussetf D, Sadeuhf SA, Goodmang SM, Andriaholinirinah NV, Randrianarivelosia M, Paulb RE, Roberta V, Ayalak FJ, Ariey F: **African apes as reservoirs of *Plasmodium falciparum* and the origin and diversification of the *Laverania* subgenus.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, **107(23)**:10561-10566.

-
47. Ekala MT, Khim N, Legrand E, Randrianarivelojosia M, Jambou R, Fandeur T, Menard D, Assi SB, Henry MC, Rogier C, Bouchier C, Mercereau-Puijalon O: **Sequence analysis of *Plasmodium falciparum* cytochrome b in multiple geographic sites.** *Malar J* 2007, **6**:164.
48. Färnet A, Rooth I, Svensson A, Snounou G, Björkman A: **Complexity of *Plasmodium falciparum* infection is consistent over time and protects against clinical disease in Tanzanian children.** *J Infect Dis* 1999, **179**(4):989-995.
49. Felger I, Beck HP. **Fitness cost of resistance to antimalarial drugs.** *Trends Parasitol* 2008, **24**(8):331-333.
50. Ferreira MU et al: **Allelic diversity at the merozoite surface protein-1 locus of *Plasmodium falciparum* in clinical isolates from the southwestern Brazilian Amazon.** *Am Soc Trop Med Hyg* 1998, **59**(3):474-480.
51. Field V, Gautret P, Schlagenhauf P, Burchard GD, Caumes E, Jensenius M, Castelli F, Gkrania-Klotsas E, Weld L, Lopez-Velez R, Vries P, Sonnemburg F, Loutan L, Parola P, The EuroTravNet network: **Travel and migration associated infectious diseases morbidity in Europe, 2008** *BMC Infect Dis* 2010, **10**:330.
52. Folarin OA, Bustamante C, Gbotosho GO, Sowunmi A, Zalis MG, Oduola AM, Happi CT: **In vitro amodiaquine resistance and its association with mutations in pfcrt and pfmdr1 genes of *Plasmodium falciparum* isolates from Nigeria.** *Acta Trop* 2011, **120**(3):224-30.
53. Foley M, Tilley L: **Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance.** *Int J Parasitol* 1997, **27**:231-240.
54. Frosch AEP, Venkatesan M, Laufer MK: **Patterns of chloroquine use and resistance in sub-Saharan Africa: a systematic review of household survey and molecular data.** *Malar J* 2011, **10**:116.
55. Gasasira AF, Kamya MR, Ochong EO, Vora N, Achan J, Charlebois E, Ruel T, Kateera F; Meva DN, Havlir D, Rosenthal PJ, Dorsey G: **Effect of trimetoprim-sulphamethoxazole on**

- the risk of malaria in HIV-infected Ugandan children living in an area of widespread antifolate resistance. *Malar J* 2010, 9:17.**
56. Gesase S, Gosling RD, Hashim R, Ord R, Naidoo I, Madebe R, Mosha JF, Joho A, Mandia V, Mrema H, Mapunda E, Savael Z, Lemnge M, Mosha F, Greenwood B, Roper C, Chandramohan D: **High resistance of *Plasmodium falciparum* to sulphadoxine/pirymethamine in Northern Tanzania and the emergence of *dhps* resistance mutation at codon 581. *PLoS ONE* 2009, 4(2):e4569.**
 57. Ghanchi NK, Martensson A, Ursing J, Jafri S, Bereczky, Hussain R, Beg MA: **Genetic diversity among *Plasmodium falciparum* field isolates in Pakistan measured with PCR genotyping of the merozoite surface protein 1 and 2. *Malar J* 2010, 9:1.**
 58. Ghani AC, Sutherland CJ, Riley EM, Drakeley CJ, Griffin JT, Gosling RD, Filipe JA: **Loss of population levels of immunity to malaria as a result of exposure-reducing interventions: consequences for interpretation of disease trends. *PLoS One* 2009, 4(2):e4383.**
 59. Giha HA, Elbashir MI, A-Elbasit IE, A-Elgadir TM, ElGhazali GE, Mackinnon MJ, Babiker HA: **Drug resistance-virulence relationship in *Plasmodium falciparum* causing severe malaria in an area of seasonal and unstable transmission. *Acta Trop* 2006, 97(2):181-187.**
 60. Gilson PR, O'Donnell RA, Nebl T, Sanders PR, Wickham ME, McElwain TF, de Koning-Ward TF, Crabb BS: **MSP119 miniproteins can serve as targets for invasion inhibitory antibodies in *Plasmodium falciparum* provided they contain the correct domains for cell surface trafficking. *Mol Microbiol* 2008, 68(1):124-138.**
 61. Gosling RD, Cairns ME, Chico RM, Chandramohan D: **Intermittent preventive treatment against malaria: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010, 8(5):589-606.**
 62. Gosling RD, Okell L, Mosha J, Chandramohan D: **The role of antimalarial treatment in the elimination of malaria. *Clin Microbiol Infect* 2011, 17(11):1617-1623.**

-
63. Guerra-Neira A, Rubio JM, Roche Royo J, Cano Ortega J, Sarrión Auñón A, Berzosa Diaz P, Benito Llanes A: **Plasmodium diversity in non-malaria individuals from the Bioko Island in Equatorial Guinea (West Central Africa).** *Int J Health Geogr* 2006, **5**:27.
64. Harrington WE, Mutabingwa TK, Muehlenbachs A, Sorensen B, Bolla MC, Fried M, Duffy PE: **Competitive facilitation of drug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria parasites in pregnant women who receive preventive treatment.** *PNAS* 2009, **106(22)**:9027-9032.
65. Hastings Im, Paget-McNichol S, Saul A: **Can mutation and selection explain virulence in human *P.falciparum* infection?** *Malar J* 2004, **3**:2.
66. Hastings IM, Smith TA: **MalHaploFreq: A computer programme for estimating malaria haplotype frequencies from blood samples.** *Malar J* 2008, **7**:130.
67. Hamour S, Melaku Y, Keus K, Wambugu J, Atkin S, Montgomery J, Ford N, Hook C, Checchi F: **Malaria in the Nuba Mountains of Sudan: baseline genotypic resistance and efficacy of the artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine and artesunate plus amodiaquine combinations.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005, **99(7)**:548-554.
68. Henning L, Schellenberg D, Smith T, Henning D, Alonso P, Tanner M, Mshinda H, Beck HP, Felger I: **A prospective study of *Plasmodium falciparum* multiplicity of infection and morbidity in Tanzanian children.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004, **98(12)**: 687-694.
69. Hoffmann EH, da Silveira LA, Tonhosolo R, Pereira FJ, Ribeiro WL, Tonon AP, Kawamoto F, Ferreira MU: **Geographical patterns of allelic diversity in the *Plasmodium falciparum* malaria-vaccine candidate, merozoite surface protein-2.** *Ann Trop Med Parasitol* 2001, **95(2)**:117-32.
70. Hoffmann EH, Ribolla PEM, Ferreira MU: **Genetic relatedness of *Plasmodium falciparum* isolates and the origin of allelic diversity at the merozoite surface protein-1 (MSP1) locus in Brazil and Vietnam.** *Malar J* 2003, **2**:24.

-
71. Huber W, Haji H, Charlwood JD, Certa U, Waliker D, Tanner M: **Genetic characterization of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* in the transition from the host to the vector.** *Parasitol* 1998, **116(2)**:95-101.
72. Huijben S, Nelson WA, Wargo AR, Sim DG, Drew DR, Read AF: **Chemotherapy, within-host ecology and the fitness of drug-resistant malaria parasites.** *Evolution* 2010, **64(10)**:2952-2968.
73. Humphreys GS, Merinopoulos I, Ahmed J, Whitty CJM, Mutabingwa TK, Sutherland CJ, Hallett RL: **Amodiaquine and artemether-lumefantrine select distinct alleles of the *Plasmodium falciparum* *mdr1* gene in Tanzanian children treated for uncomplicated malaria.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51(3)**:991-997.
74. Hyde JE: **Antifolate resistance in Africa and the 164-dollar question.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008, **102(4)**:301-303.
75. Ibrahim ML, Gay-Andrieu F, Adehossi E, Lacroix V, Randrianarivelojosa M, Duchemin JB. **Field-based evidence for the linkage disequilibrium of *pfert* and *pfdhfr* drug-resistant malaria genotypes and clinical profiles of severe malaria in Niger.** *Microbes Infect* 2007, **9(5)**:599-604.
76. Issifou S, Djikou S, Sanni A, Lekoulou F, Ntoumi F: **No influence of season of transmission nor age of patients on the complexity and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* infection in Cotonou, Benin.** *Bull Soc Pathol Exot* 2001, **94(2)**:195-198.
77. Ittarat I, Asawamahsakda W, Meshnik SR: **The effects of antimalarial on the *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase.** *Exp Parasitol* 1994, **79**:50-56.
78. John CC, Kutamba E, Mugarura K, Opoka RO: **Adjunctive therapy for cerebral malaria and other severe forms of *Plasmodium falciparum* malaria.** *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010, **8(9)**:997-1008.
79. Kadekoppala M, Holder AA: **Merozoite surface protein of the malaria parasite: The MSP1 complex and the MSP7 family.** *Int J Parasitol* 2010, **40**:1155-1161.

-
80. Kang JM, Moon SU, Kim JY, Cho SH, Lin K, Sohn WM, Kim TS, Na BK: **Genetic polymorphism of merozoite surface protein-1 and merozoite surface protein-2 in *Plasmodium falciparum* field isolates from Myanmar.** *Malar J* 2010, **9**:131.
81. Kapito-Tembo A, Meshnick SR, van Hesbroek MB, Phiri K, Fitzgerald M, Mwapasa V: **Marked reduction in prevalence of malaria parasitaemia and anaemia in HIV-infected pregnant women taking cotrimoxazole with or without sulphadoxine-pyrimethamine intermittent preventive therapy during pregnancy in Malawi.** *J Infect Dis* 2011, **203**:464-472.
82. Khalil IF, Alifrangis M, Tarimo DS, Staalso T, Satti GMH, Theander TG, Ronn AM, Bygbjerg IC: **The roles of the pfcrt 76T and pfmdr1 86Y mutations, immunity and the initial level of parasitaemia, in predicting the outcome of chloroquine treatment in two areas with different transmission intensities.** *An Trop Med Parasitol* 2005, **99(5)**:441-448.
83. Kiwanuka GN: **Genetic diversity in *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 and 2 coding genes and its implications in malaria epidemiology: a review of published studies from 1997-2007.** *J Vector Borne Dis* 2009, **46**:1-12.
84. Klein EY, Smith DL, Boni MF, Laxminarayan R: **Clinically immune hosts as a refuge for drug-sensitive malaria parasites.** *Malar J* 2008, **7**:67.
85. Kleinschmidt I, Sharp B, Benavente LE, Schwabe C, Torrez M, Kuklinski J, Morris N, Raman J, Carter J: **Reduction in infection with *Plasmodium falciparum* one year after the introduction of malaria control interventions on Bioko Island, Equatorial Guinea.** *Am J Trop Med Hyg* 2006, **74(6)**:972-978.
86. Kleinschmidt I, Torrez M, Schwabe C, Benavente L, Seocharan I, Jituboh D, Nsen G Sharp B: **Factors influencing the effectiveness of malaria control in Bioko Island, Equatorial Guinea.** *Am J Trop Med Hyg* 2007, **76(6)**:1027-1032.

-
87. Kleinschmidt I, Schwabe C, Murugasampalay S, Segura JL, Sima V, Alves Mabunda SJ, Coleman M: **Combining Indoor Residual Spraying and Insecticide-Treated Net Interventions.** *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2009, **81(3)**:519-524.
88. Knowles RM, Das Gupta B: **A study of monkey–malaria and its experimental transmission to man.** *Ind Med Gaz* 1932, **67**: 301-320.
89. Koepfli C, Schoepfli S, Bretscher M, Lin E, Kiniboro B, Zimmerman PA, Siba P, Smith TA, Mueller I, Felger I: **How much remains undetected? Probability of molecular detection of human plasmodia in the field.** *PLoS One* 2011, **6(4)**:e19010.
90. Krief S, Escalante AA, Pacheco MA, Mugisha L, Andre´ C, Halbwax M, Fischer A, Krief JM, Kasenene JM, Crandfield M, Cornejo OE, Chavatte JM, Lin C, Letourneur F, Grüner AC, McCutchan TF, Rénia L, Snounou G: **On the Diversity of Malaria Parasites in African Apes and the Origin of *Plasmodium falciparum* from Bonobos.** *PLoS Pathog* 2010, **6(2)**:e1000765.
91. Krogstad DJ: **Malaria as a reemerging disease.** *Epidemiol Rev* 1996, **18(1)**:77-89.
92. Kuesap J, Rungsrihirunrat K, Thongdee P, Ruangweeraut R, Na-Bangchang K: **Change in mutation patterns of *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase (*Pvdhfr*) and dihydropteroate synthase (*Pvdhps*) in *P. vivax* isolates from malaria endemic areas of Thailand.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011, **106(1)**:130-133.
93. Kuile FO, Van Eijk AM, Scott JF: **Effect of sulphadoxine-pyrimethamine resistance on the efficacy of intermittent preventive therapy for malaria control during pregnancy.** *J Am Med Ass* 2007, **297(23)**:2603-2616.
94. Kun JF, Schmidt-Ott RJ, Lehman LG, Lell B, Luckner D, Greve B, Matousek P, Kremsner PG: **Merozoite surface antigen 1 and 2 genotypes and rosetting of *Plasmodium falciparum* in severe and mild malaria in Lambarene, Gabon.** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 1998, **92**:110-114.

-
95. Laufer MK, Takala-Harrison S, Dzinjalama FK, Stine OC, Taylor TE, Plowe CV: **Return of chloroquine-susceptible *falciparum* malaria in Malawi was a re-expansion of diverse susceptible parasites.** *J Infect Dis* 2010, **202(5)**: 801-808.
96. Lee KS, Cox-Singh J, Singh B: **Morphological features and differential counts of *Plasmodium knowlesi* parasites in naturally acquired human infections.** *Malar J* 2009, **8**:73.
97. Lehane AM, van Schalkwyk DA, Valderramos SG, Fidock DA, Kirk K: **Differential drug efflux or accumulation does not explain variation in the chloroquine response of *Plasmodium falciparum* strains expressing the same isoform of mutant PfCRT.** *Antimicrob Agents Chemother* 2011, **55(5)**:2310-2318.
98. Liljander A, Wiklund L, Falk N, Kweku M, As Mårtensson M, Felger I, Färnert A: **Optimization and validation of multi-coloured capillary electrophoresis for genotyping of *Plasmodium falciparum* merozoite surface proteins (*msp1* and 2).** *Malar J* 2009, **8**:78.
99. Lin JT, Juliano JJ, Wongsrichanalai C: **Drug-resistant malaria: The era of ACT.** *Curr Infect Dis Rep* 2010, **12(3)**:165-173.
100. Londono-Renteria B, Eisele TP, Keating J, Bennett A, Krogstad DJ: **Genetic diversity in the merozoite surface protein 1 and 2 genes of *Plasmodium falciparum* from the Artibonite Valley of Haiti.** *Acta Trop* 2011, doi:10.1016.
101. Lyon JA, Angov E, Fay MP, Sullivan JS, Girourd AS, Robinson SJ, Bergmann-Leitner ES, Duncan EH, Darko CA, Collins WE, Long CA, Barnwell JW: **Protection induced by *Plasmodium falciparum* MSP142 Is strain-specific, antigen and adjuvant dependent, and correlates with antibody responses.** *PLoS One* 2008, **3(7)**:e2830.
102. Mackinnon MJ, Marsh K. **The selection landscape of malaria parasites.** *Science* 2010, **328(5980)**:866-871.

-
103. Magalhães RJ, Clements AC: **Mapping the risk of anaemia in preschool-age children: the contribution of malnutrition, malaria, and helminth infections in West Africa.** *PLoS Med.* 2011, **8(6)**:e1000438.
104. Malisa AL, Pearce RJ, Abdulla S, Mshinda H, Kachur PS, Bloland P, Roper C: **Drug coverage in treatment of malaria and the consequences for resistance evolution –evidence from the use of sulphadoxine/pyrimethamine.** *Malar J* 2010, **9**:190.
105. Mayengue PI, Kalmbach Y, Issifou S, Kremsner PG, Ntoumi F: No variation in the prevalence of point mutations in the Pfcrt and Pfmdr1 genes in isolates from Gabonese patients with uncomplicated or severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasitol Res* 2007, **100(3)**:487-493.
106. Mayengue PI, Ndounga M, Malonga FV, Bitemo M, Ntoumi F: **Genetic polymorphism of merozoite surface protein-1 and merozoite surface protein-2 in *Plasmodium falciparum* isolates from Brazzaville, Republic of Congo.** *Malar J* 2011, **10**:276.
107. Mayor A, Aponte JJ, Fogg C, Saúte F, Greenwood B, Dgedge M, Menendez C, Alonso PL: **The epidemiology of malaria in adults in a rural area of southern Mozambique.** *Malar J* 2007, **6**:3.
108. McCollum AM, Poe AC, Hamel M, Huber C, Zhou Z, Shi YP, Ouma P, Vulule J, Bloland P, Slutsker L, Barnwell JW, Udhayakumar V, Escalante AA: **Antifolate resistance in *Plasmodium falciparum*: origins and identification of novel *dhfr* alleles.** *J Infect Dis* 2006, **194**:189-197.
109. McCollum AM, Mueller K, Villegas L, Udhayakumar V, Escalante AA: **Common origin and fixation of *Plasmodium falciparum dhfr* and *dhps* mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance in a low-transmission area in South America.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51(6)**:2085-2091.
110. McMorro ML, Aidoo M, Kachur SP: **Malaria rapid diagnostic tests in elimination settings-can they find the last parasite?** *Clin Microbiol Infect* 2011, **17(11)**:1624-1631.

-
111. Mackinnon MJ, Marsh K. **The selection landscape of malaria parasites.** *Science* 2010, **328(5980)**:866-871.
112. Meek S, Miller J, Nahlen B, Otten M, Ratcliffe A, López MH, Slutsker L, Greenwood B, Tanner M (malERA Consultative group on Diagnoses and Diagnostics): **A Research Agenda for Malaria Eradication: Monitoring, Evaluation, and Surveillance.** *PLoS Med* 2011, **8(1)**:e1000400.
113. Meerman L, Ord R, Boussema JT, van Niekerk M, Osman E, Hallett R, Pinder M, Walraven G, Sutherland CJ: **Carriage of chloroquine-resistant parasites and delay of effective treatment increase the risk of severe malaria in Gambian children.** *J Infect Dis* 2005; **192(9)**:1651-1657.
114. Mendes C, Dias F, Figueredo J, Mora VG, Cano J, De Sousa B, Do Rosario VE, Benito A, Berzosa P, Arez AP: **Duffy negative antigen is non longer a barrier to *Plasmodium vivax*-molecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea).** *PLoS Negl Trop Dis* 2011, **5(6)**:e1192.
115. Miller LH, Greenwood B: **Malaria--a shadow over Africa.** *Science* 2002, **298(5591)**:121-122.
116. Mita T, Tanabe K, Kita K: **Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance.** *Parasitol Int* 2009, **58(3)**:201-209.
117. Mita T: **Origins and spread of *pf dhfr* mutant alleles in *Plasmodium falciparum*.** *Acta Trop* 2010, **114**:166-170.
118. Mockenhaupt FP, Bousema JT, Eggelte TA, Schreiber J, Ehrhardt S, Wassilew N, Otchwemah RN, Sauerwein RW, Bienzle U: ***Plasmodium falciparum dhfr* but not *dhps* mutations associated with sulphadoxine-pyrimethamine treatment failure and gametocyte carriage in northern Ghana.** *Trop Med Int Health* 2005, **10(9)**:901-908.

-
119. Mockenhaupt FP, Bedu-Addo G, Junge C, Hommerich L, Eggelte TA, Bienzle U: **Markers of sulfadoxine-pyrimethamine-resistant *Plasmodium falciparum* in placenta and circulation of pregnant women.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51(1)**:332-334.
120. Msangeni HA, Kamugisha ML, Sembuche SH, Malecela EK, Akida JA, Temba FF, Mmbando BP, Lemnge MM: **Prospective study on severe malaria among in-patients at Bombo regional hospital, Tanga, north-eastern Tanzania.** *BMC Infect Dis* 2011, **11**:256.
121. Mu J, Myers RA, Jiang H, Liu L, Ricklefs S, Waisberg M, Chotivanich K, Wilairata P, Krudsood S, White NJ, Udomsangpetch R, Cui L, Ho M, Ou F, Li H, Song J, Li G, Wang X, Seila S, Sokunthea S, Socheat D, Sturdevant DE, Porcella SF, Fairhurst RM, Wellems TE, Awadalla P, Su X: ***Plasmodium falciparum* genome-wide scans for positive selection, recombination hot spots and resistance to antimalarial drugs.** *Nat Genet* 2010, **42(3)**:268-271.
122. Muema DKM, Ndungu FM, Kinyanjui SM, Berkley JA: Effect of HIV infection on the acute antibody response to malaria antigens in children: an observational study. *Malar J* 2011, **10**:55.
123. Mula P, Fernández-Martínez A, de Lucio A, Ramos JM, F Reyes, González V, Benito A, Berzosa P: **Detection of high levels of mutations involved in anti-malarial drug resistance in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* at a rural hospital in southern Ethiopia.** *Malar J* 2011, **10**:214.
124. Müller DA, Charlwood JD, Felger I, Ferreira C, do Rosario V, Smith T: **Prospective risk of morbidity in relation to multiplicity of infection with *Plasmodium falciparum* in Sao Tome.** *Acta Trop* 2001, **78(2)**:155-162.
125. Naidoo I, Roper C: **Following the path of most resistance: *dhps* K540E dispersal in African *Plasmodium falciparum*.** *Trends in Parasitology* 2010, **26**:447-456.
126. Nájera JA, González-Silva M, Alonso PL: Some Lessons for the Future from the Global Malaria Eradication Programme (1955–1969). *PLoS Med* 2011, **8 (1)**:e1000412.

-
127. Nakazawa S, Culleton R, Maeno Y: **In vivo and in vitro gametocyte production of *Plasmodium falciparum* isolates from northern Thailand.** *Int J Parasitol* 2011, **41**(3-4):317-323.
128. Nassir E, Abdel-Muhsin AM, Suliaman S, Kenyon F, Kheir A, Geha H, Ferguson HM, Walliker D, Babiker HA: **Impact of genetic complexity on longevity and gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* during the dry and transmission-free season of eastern Sudan.** *Int J Parasitol* 2005, **35**(1):49-55.
129. Nkhoma S, Molyneux M, Ward S: ***In vitro* antimalarial susceptibility profile and *prcr*t/*pfmdr*-I genotypes of *Plasmodium falciparum* field isolates from Malawi.** *Am J Trop Med Hig* 2007, **76**:1107-1112.
130. Noranate N, Prugnolle F, Jouin H, Adama Tall A, Marrama L, Sokhna Ch, Ekala MT, Guillotte M, Bischoff E, Bouchier C, Patarapotikul J, Ohashi J, Trape JF, Rogier C, Mercereau-Puijalon O: **Population diversity and antibody selective pressure to *Plasmodium falciparum* MSP1 block2 locus in an African malaria-endemic setting.** *BMC Microbiol* 2009, **9**:219.
131. Okiro EA, Al-Taiar A, Reyburn H, Idro R, Berkley JA, Snow RW: **Age patterns of severe paediatric malaria and their relationship to *Plasmodium falciparum* transmission intensity.** *Malar J* 2009, **8**:4.
132. O'Meara WP, Mangeni JN, Steketee R, Greenwood B: **Changes in the burden of malaria in sub-Saharan Africa.** *Lancet Infect Dis* 2010, **10**(8):545-555.
133. Omosun YO, Anumudu CI, Adoro S, Odaibo AB, Sodeinde O, Holder AA, Nwagwu M, Nwuba RI: **Variation in the relationship between anti-MSP-1(19) antibody response and age in children infected with *Plasmodium falciparum* during the dry and rainy seasons.** *Acta Trop.* 2005, **95**(3):233-247.
134. Ong'echa JM, Raballah EO, Kempaiah PM, Anyona SB, Were T, Davenport GC, Konah S, Vulule JM, Ouma C, Hittner JB, Perkins DJ: **Polymorphic variability in the 3' untranslated**

- region (UTR) of IL12B is associated with susceptibility to severe anaemia in Kenyan children with acute *Plasmodium falciparum* malaria. *BMC Genet* 2011, **12**:69.**
135. Onyamboko MA, Meshnick SR, Fleckenstein L, Koch MA, Atibu J, Lokomba V, Douoguih M, Hemingway-Foday J, Wesche D, Ryder RW, Bose C, Wright LL, Tshefu AK, Capparelli EV: **Pharmacokinetics and pharmacodynamics of artesunate and dihydroartemisinin following oral treatment in pregnant women with asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections in Kinshasa DRC. *Malar J* 2011, **10**:49.**
 136. Ord R, Alexander N, Dunyo S, Hallett R, Jawara M, Targett G, Drakeley CJ, Sutherland CJ: **Seasonal carriage of pfcrt and pfmdr1 alleles in Gambian *Plasmodium falciparum* imply reduced fitness of chloroquine-resistant parasites. *J Infect Dis* 2007, **196(11)**:1613-1619.**
 137. Osungbade KO, Oladunjove OO: **Prevention of congenital transmission of malaria in sub-Saharan African countries: challenges and implications for health systems strengthening. *J Trop Med* 2011,doi:10.1155/2012/648456.**
 138. Padley D, Moody AH, Chiodini PL, Saldanha J: **Use of a rapid single round, multiplex PCR to detect malarial parasites and identify the species present. *Ann Trop Med Parasitol* 2003, **97(2)**:131-137.**
 139. Pan D, Hu J, Ma Q, Pan W, Li M: **Diversity and prevalence of the C-terminal region of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in China. *Acta Trop* 2010, **116(3)**:200-205.**
 140. Pardo G, Descalzo MA, Molina L, Custodio E, Lwanga M, Mangué C, Obono J, Nchama A, Roche J, Benito A, Cano J: **Impact of different strategies to control *Plasmodium* infection and anaemia on the island of Bioko (Equatorial Guinea). *Malar J* 2006, **5**:10.**
 141. University of Maryland School of Medicine 2002: **PCR-allele-specific restriction analysis (ASRA) Protocols for *Plasmodium falciparum* drug-resistance mutation analyses.** (http://medschool.umaryland.edu/cvd/2002_pcr_asra.htm).

-
142. Petersen I, Eastman R, Lanzer M: **Drug resistant malaria: Molecular mechanisms and implications for public health.** *Fed Eur Bioch Soc Letts* 2011, **585(11)**:1551-1562.
143. Peterson DS, Milhous WK, Wellems TE: **Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, **87(8)**:3018-3022.
144. Picot S, Olliaro P, Monbrison F, Bienvenue AL, Price RN, Ringwald P: **A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in falciparum malaria.** *Malar J* 2009, **8**:89.
145. Pimentel S, Nogueira F, Benchimol C, Quinhento V, Bom J, Varandas L, do Rosario V, Bernardino L: **Detection of Atovaquone-proguanil resistance conferring mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b gen in Luanda, Angola.** *Malar J* 2006, **5**:30.
146. Plowe CV, Djimde A, Bouare M, Doumbo O, y Wellems TE: **Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa.** *Am. J. Trop. Med Hyg* 1995, **52**:565-568.
147. Plowe CV, Cortese JF, Djimde A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, Winstanley PA, Estrada-Franco JG, Mollinedo R E, Avila JC, Cespedes JL, Carter D, Doumbo OK : **Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance.** *J Infect Dis* 1997, **176**:1590-1596.
148. Plowe CV: **Monitoring antimalarial drug resistance: making the most of the tools at hand.** *J Exp Biol* 2003, **206(21)**:3745-3752.
149. Price RN, Douglas NM, Anstey NM: **New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance.** *Curr Opin Infect Dis* 2009, **22(5)**:430-435.

-
150. Raman J, Little F, Roper C, Kleinschmidt I, Cassam Y, Maharaj R, Barnes KJ. **Five years of large scale *dhfr* and *dhps* mutation surveillance following the phased implementation of artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine in Maputo province, Southern Mozambique.** *Am J Trop Med Hyg* 2010, **82(5)**:788-794.
151. Ratcliff A, Siswantoro H, Kenangalem E, Maristela R, Wuwung RM, Laihad F, Ebsworth EP, Anstey NM, Tjitra E, Price RN. **Two fixed-dose artemisinin combinations for drug-resistant *falciparum* and *vivax* malaria in Papua, Indonesia: an open-label randomised comparison.** *Lancet*. 2007, **369(9563)**:757-765.
152. Rey S, Zuza I, Martínez-Mondéjar B, Rubio JM, Merino FJ: **Imported malaria in an area in southern Madrid, 2005-2008.** *Malar J* 2010, **9**:290.
153. Rich SM, Ferreira MU, Ayala FJ: **The origin of antigenic diversity in *Plasmodium falciparum*.** *Parasitology Today* 2000, **16(9)**:390-396.
154. Robert F, Ntoumi F, Angel G, Candito D, Rogier C, Fandeur T, Sarthou JL, Mercereau-Puijalon O: **Extensive genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates collected from patients with severe malaria in Dakar, Senegal.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996, **90**:704-711.
155. Robert F, Ntoumi F, Angel G, Candito D, Rogier C, Fandeur T, Sarthou JL, Mercereau-Puijalon O: **Extensive genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates collected from patients with severe malaria in Dakar, Senegal.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996, **90**:704-711.
156. Roberts L, Enserink M: **Malaria. Did they really say ... eradication?** *Science* 2007, **318(5856)**:1544-1545.
157. Roche J, Guerra-Neira A, Raso J, Benito A: **Surveillance of *in vivo* resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs from 1992 to 1999 in Malabo (Equatorial Guinea).** *Am J Trop Med Hyg* 2003, **68(5)**:598-601.

-
158. Rogers WO, Sem R, Tero T, Chim P, Lim P, Muth S, Socheat D, Arie F, Wongsrichanalai C: **Failure of artesunate-mefloquine combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in southern Cambodia.** *Malar J* 2009, **8**:10.
159. Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RF, Taylor DW: **Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity.** *Lancet Infect Dis* 2007, **7**(2):105-117.
160. Roll Back Malaria: The Global Partnership for a Malaria-free World.
<http://www.rbm.who.int/>
161. Roy SW, Ferreira MU, Hartl DL: **Evolution of allelic dimorphism in malarial surface antigens.** *Heredity* 2008, **100**:103-110.
162. Roy SW, Weedall GD, da Silva RL, Polley SD, Ferreira MU: **Sequence diversity and evolutionary dynamics of the dimorphic antigen merozoite surface protein-6 and other *msp* genes of *Plasmodium falciparum*.** *Gene* 2009, **443**:12-21.
163. Rubio JM, Benito A, Roche J, Berzosa PJ, García ML, Micó M, Edú M, Alvar J: **Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in Equatorial Guinea.** *Am J Trop Med Hyg* 1999, **60**(2):183-187.
164. Sá JM, Twu O, Hayton K, Reyes S, Fay MP, Ringwald P, Wellems TE: **Geographic patterns of *Plasmodium falciparum* drug resistance distinguished by differential responses to amodiaquine and chloroquine** *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, **106** (45):18883-18889.
165. Salgueiro P, Vicente JL, Ferreira C, Teófilo V, Galvao A, do Rosario VE, Cravo P, Pinto J: **Tracing the origin and signatures of selection of antifolate resistance in island populations of *Plasmodium falciparum*.** *BMC Infect Dis* 2010, **10**:163.
166. Sallenave-Sales S, Daubersies P, Mercereau-Puijalon O, Rahimalala L, Contamin H, Druilhe P, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz MF: ***Plasmodium falciparum*: a comparative analysis of the genetic diversity in malaria-mesoendemic areas of Brazil and Madagascar.** *Parasitol Res* 2000, **86**:692-698.

-
167. Schneider P, Chan BH, Reece SE, Read AF: **Does the drug sensitivity of malaria parasites depend on their virulence?** *Malar J* 2008, **7**:257.
168. Schultz L, Wapling J, Mueller I, Ntsuke PO, Senn N, Nale J, Kiniboro B, Buckee CO, Tavul L, Siba PM, Reeder JC, Barry AE: **Multilocus haplotypes reveal variable levels of diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* in Papua New Guinea, a region of intense perennial transmission.** *Malar J* 2010, **9**:336.
169. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ: **A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings.** *Lancet* 2004, **363**:1017-1024.
170. Sisowath C, Petersen I, Veiga MI, Mårtensson A, Premji Z, Björman A, Fidock DA, Gil JP. **In vivo selection of *Plasmodium falciparum* parasites carrying the chloroquine-susceptible pfcrt K76 allele after treatment with artemether-lumefantrine in Africa.** *J Infect Dis* 2009, **199**:750-757.
171. Siswantoro H, Russell B, Ratcliff A, Prasetyorini B, Chalfein F, Marfurt J, Kenangalem E, Wuwung M, Piera KA, Ebsworth EP, Anstey NM, Tjitra E, Price RN: **In Vivo and In Vitro Efficacy of Chloroquine against *Plasmodium malariae* and *P. ovale* in Papua, Indonesia.** *Antimicrob Agents Chemother* 2011, **55**(1):197-202.
172. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Siripoon N, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN: **High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction.** *Mol Biochem Parasitol* 1993, **61**(2):315-320.
173. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, SI Hay: **The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria.** *Nature* 2005, **434**(7030):214-217.
174. Somé AF, Seré YY, Dokomajilar C, Zongo I, Rouamba N, Greenhouse B, Ouédraogo JB, Rosenthal PJ: **Selection of known *Plasmodium falciparum* resistance-mediating polymorphisms by artemether-lumefantrine and amodiaquine-sulfadoxine-**

- pyrimethamine but not dihydroartemisinin-piperaquine in Burkina Faso.** *Antimicrob Agents Chemother* 2010, **54(5)**:1949-1954.
175. Soulama I, Bigoga JD, Ndiaye M, Bougouma EC, Quagraine J, Casimiro PN, Stedman TT, Sirima SB: **Genetic diversity of polymorphic vaccine candidate antigens (Apical Membrane Antigen-1, Merozoite Surface Protein-3, and Erythrocyte Binding Antigen-175) in *Plasmodium falciparum* isolates from Western and Central Africa.** *Am J Trop Med Hyg* 2011, **84(2)**:276-284.
176. Sridaran S, McClintock SK, Syphard LM, Herman KM, Barnwell JW, Udhayakumar V: **Anti-folate drug-resistance in Africa: meta-analysis of reported dihydrofolate reductase (*dhfr*) and dihydropteroate synthase (*dhps*) mutant genotype frequencies in African *Plasmodium falciparum* parasite populations.** *Malar J* 2010, **9**:247.
177. Steketee R, Voltaire F, Hay SI, Alonso PL, Atta HY, Bassat Q, Bakayita N, Clark JP, Doumbo OK, Drakeley C, Eckert EL, Eisele T, Gausi K, Guinovart C, Hayes N, Kilian A, Lama M, Meek S, Miller J, Nahlen B, Otten M, Ratcliffe A, López MH, Slutsker L, Greenwood B, Tanner M (malERA Consultative group on Diagnoses and Diagnostics): **A Research Agenda for Malaria Eradication: Monitoring, Evaluation, and Surveillance.** *PLoS Med* 2011, **8(1)**:e1000400.
178. Steketee RW, Campbell CC: Impact of national malaria control scale-up programmes in Africa: magnitude and attribution of effects. *Malar J* 2010, **9**:299.
179. Su XZ, Kirkman La, Fujioka H, Wellems Te: **Complex polymorphisms in an approximately 330 kDa protein are linked to chloroquine-resistant *P.falciparum* in Southeast Asia and Africa.** *Cell* 1997, **91**:593-603.
180. Sutherland CJ, Babiker H, Mackinnon MJ, Ranford-Cartwright L, Sayed BB. **Rational deployment of antimalarial drugs in Africa: should first-line combination drugs be reserved for paediatric malaria cases?** *Parasitology*. 2011, **138(12)**:1459-1468.

-
181. Sutton PL, Clark EH, Silva C, Branch OH: **The *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 19 KD antibody response in the Peruvian Amazon predominantly targets the non-allele specific, shared sites of this antigen.** *Malar J* 2010, **9**:3.
182. Takala SL, Branch OL, Escalante AA, Kariuki S, Wootton J, Lal AA: **Evidence for intragenic recombination in *Plasmodium falciparum*: identification of a novel allele family in block 2 of merozoite surface protein-1: Asembo Bay Area Cohort Project XIV.** *Mol Biochem Parasitol* 2002, **125(1-2)**:163-171.
183. Takala SL, Escalante AA, Branch OH, Kariuki S, Biswas S, Chaiyaroj SC, Lal AA: **Genetic diversity in the block 2 region of the merozoite surface protein 1 (MSP-1) of *Plasmodium falciparum*: Additional complexity and selection and convergence in fragment size polymorphism.** *Infect Genet Evol* 2006, **6(5)**:417-424.
184. Takala SL, Coulibay D, Thera MA, Dicko A, Smith DL, Guindo AB, Kone AK, Traore K, Ouattara A, Djimde AA, Sehdev PS, Lyke KE, Dialo DA, Doumbo OK, Plowe CV: **Dynamics of polymorphism in malaria vaccine antigen at a vaccine-testing site in Mali.** *PloS Med* 2007, **4(3)**:523-534.
185. Takala SL, Plowe CV: **Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: preventing and overcoming 'vaccine resistant malaria'.** *Parasite Immunol* 2009, **31(9)**:560-573.
186. Takala SL, Coulibaly D, Thera MA, Batchelor AH, Cummings MP, Escalante AA, Ouattara A, Traoré K, Niangaly A, Djimdé AA, Doumbo OK, Plowe CV: **Extreme Polymorphism in a Vaccine Antigen and Risk of Clinical Malaria: Implications for Vaccine Development.** *Sci Transl Med* 2009, **1(2)**:2ra5.
187. Tanabe K, Mackay M, Goman M, Scaife JG: **Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.** *J Mol Biol* 1987, **195**:273-287.
188. The malaria genomic epidemiology network: **A global network for investigating the genomic epidemiology of malaria.** *Nature* 2008, **456**:732-738.

-
189. The RTS,S Clinical Trials Partnership: **First Results of Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Children.** *N Engl J Med* 2011, 10.1056/nejmoa1102287.
190. Vafa M, Troye-Blomberg M, Anchang J, Garcia A, Migot-Nabias F: **Multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection in asymptomatic children in Senegal: relation to transmission, age and erythrocyte variants** *Malar J* 2008, 7:17.
191. Van Eijk AM, Hill J, Alegana VA, Kirui V, Gething PW, Kuile FO, Snow RW: **Coverage of malaria protection in pregnant women in sub-Saharan Africa: a synthesis and analysis of national survey data.** *Lancet Infect Dis* 2011, **11(3)**:190-207.
192. Vinayak S, Alam MT, Mixson-Hayden T, McCollum AM, Sem R, Shah NK, Lim P, Muth S, Rogers WO, Fandeur T, Barnwell JW, Escalante AA, Wongsrichanalai C, Ariei F, Meshnick SR, Udhayakumar V: **Origin and evolution of sulphadoxine resistant *Plasmodium falciparum*.** *PLoS Pathog* 2010, **6(3)**:e1000830.
193. Wang P, Read M, Sims PFG, Hyde JE: **Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dhhydropteroate synthetase and a additional factor associated with folate utilization.** *Mol Microbiol* 1997, **23**:979-986.
194. Wélé M, Djimdé AA, Guindo A, Beavogui AH, Traoré IZ, Sadou A, Blaise D, Diallo DA, Wellems TH, Doumbo OK: **High frequency of PfCRT76 in two Malian villages and its prevalence in severe relative to non severe malaria.** *Acta Trop* 2011, **119(1)**:11-13.
195. Wellems TE, Plowe CV: **Chloroquine-resistant malaria.** *J Infect Dis* 2001, **184**:770-776.
196. White NJ: **Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs in vivo.** *Antimicrob Agents Chemother* 1997, **41(7)**:1413-1422.
197. White NJ: ***Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite.** *Clin Infect Dis* 2008, **46**:172-173.
198. Wickremasinghe R, Galapaththy GNL, Fernando WAP, de Monbrison F, Wijesinghe RS, Mendis KN, Picot S, Ringwald P, Wickremasinghe AR: **Short Report: An Indigenous Case of *Plasmodium ovale* Infection in Sri Lanka.** *Am J Trop Med Hyg* 2008, **78(2)**:206-207.

199. Wongsrichanalai Ch, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR: **Epidemiology of drug-resistant malaria.** *Lancet Infect Dis* 2002, **2**:209-218.
200. World Health Organization: **Severe falciparum malaria.** World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000, **94**(1):S1-90.
201. World Health Organization: **Eighth World Health Assembly** (Mexico, D.F., 10–27 May). Official records, Geneva 1955, **63**: 236-240.
202. World Health Organization: **Re-examination of the global strategy of malaria eradication.** Twenty-second World Health Assembly, Part I. Official records, Geneva 1969, **176**(13):106–126).
203. World Health Organisation: **Guidelines for the treatment of malaria.** 2010, *2nd edition*.
204. World Health Organisation 2010. **Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010.**
205. WHO African Region: **Country antimalarial drug policies.** (http://www.who.int/malaria/am_drug_policies_by_region_afro/en/index.html).
206. Zongo I, Dorsey G, Rouamba N, Tinto H, Dokomajilar C, Guiguemde RT, Rosenthal PJ, Ouedraogo JB: **Artemether-lumefantrine versus amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine for uncomplicated falciparum malaria in Burkina Faso: a randomised non-inferiority trial.** *Lancet* 2007, **369**(9560):491-498.
207. Zwang J, Oliaro P, Barennes H, Bonnet M, Brasseur P, Bukirwa H, Cohuet S, D'Alessandro U, Djimdé A, Karema C, Guthmann JP, Hamour S, Ndiaye JL, Mårtensson A, Rwagacondo C, Sagara I, Same-Ekobo A, Sirima SB, van den Broek I, Yeka A, Taylor WR, Dorsey G, Randrianarivelojosia M. **Efficacy of artesunate-amodiaquine for treating uncomplicated falciparum malaria in sub-Saharan Africa: a multi-centre analysis.** *Malar J* 2009, **8**:203.

-
208. Zwetyenga J, Rogier C, Tall A, Fontenille D, Snounou G, Trape JF, Mercereau-Puijalon O:
No influence of age on infection complexity and allelic distribution in *Plasmodium falciparum* infections in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria.
Am J Trop Med Hyg 1998, **59**:726-735.